LIBRARY
FISH & WILDLIFE SERVICE
PACIFIC OCEANIC FISHERY
INVESTIGATIONS
DEC 11 1953

北海道大学
水産学部研究彙報

第四巻　第一号

BULLETIN
OF THE
FACULTY OF FISHERIES
HOKKAIDO UNIVERSITY

VOL. 4, NO. 1

北海道大学水産学部（函館）発行

HAKODATE, JAPAN

MAY, 1953

目　次

Studies on the Manufacture of Canned Crab.

Part Ⅰ. On the Manufacture of Canned Crab from *Erimacrus isenbeckii* (*Brandt*).

Report Ⅰ. The Relation between the Freshness of Raw Crab Meat Material and the Quality of the Canned Product.

Ⅰ. On the Velocity of Autolytic Decomposition of Meat of *Erimacrus isenbeckii*. …… Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Morihisa KIMURA (1)

Ⅱ. Velocity of Bacterial Decomposition of the Meat of *Erimacrus isenbeckii*. …… Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Terushige MOTOHIRO (7)

Ⅲ. Discussion of Methods for Determining the Freshness of Meat of *Erimacrus isenbeckii*. … Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Terushige MOTOHIRO (14)

Ⅳ. Studies on the Influences of the Freshness of Raw Crab Meat and Duration of Storage after Boiling upon the Quality of Canned Crab Meat. …… Eiichi TANIKAWA, Yasunosuke INOUE and Minoru AKIBA (22)

Behavior of Colloids in extremely diluted Solution of Polyelectrolyte as observed by the Change in Spectrum of Metachromatic Dye. …… Kenji KATO (32)

Thermal Decomposition of Algins.

As determined by Thermo-balance Method.… …… Kenji KATO (40)

Studies on Shark Muscle.

Part 3. Putrefaction and Indol Content of Shark Meat. … Keiichi OHOISHI (43)

ワカサギの生態学的研究

第3報　網走湖産ワカサギに於ける鱗相による年令査定の不確実性と其の原因 …… 浜田啓吉 (46)

スルメイカの生化学的研究

第3報　「スルメイカ」筋肉の塩基性物質について …… 吉村克二・柴田猛 (54)

アルギンの製造機構に関する研究

第2報　遊離アルギン酸の溶解について …… 鈴木昇 (60)

第3報　アルギン酸カルシウムの複分解による溶解について …… 鈴木昇 (65)

第4報　アルギン酸カルシウムのイオン交換による溶解について… 鈴木昇 (69)

アルギン稀薄溶液の膠質学的平衡に関する研究

第1報　アルギン酸ソーダ溶液の粘性挙動 …… 加藤健司 (76)

第2報　アルギン酸ソーダ溶液の容積収縮について …… 加藤健司 (82)

海藻に関する化学的研究

第7報　各種海藻中のチロシン及びトリプトファン含量に就て …… 高木光造 (86)

第8報　各種海藻中のスレオニン及びセリン含量に就て …… 高木光造 (92)

塩辛の細菌学的研究

第5報　細菌の蛋白質分解酵素について（其の1）
Bacillus subtilis の二、三の性質について

第6報　細菌の蛋白質分解酵素について（其の2）
Bacillus subtilis の蛋白質分解酵素の賦活性物質 …… 長尾清 (96)

細菌の酵素に関する研究

第2報　*Micrococcus lysodeikticus* の Catalaseについて(其の1) 長尾清(108)

噴火湾に於ける定置網の研究

第2報　自記ロープ張力計の試作 …… 小林喜一郎・西沢敏(112)

本学部教官研究業績 …… …… (116)

STUDIES ON THE MANUFACTURE OF CANNED CRAB

Eiichi TANIKAWA

(Laboratory of Marine Foods Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The history of manufacture of canned crab is old in Japan; as long ago as about 1892-1893 canned crab was being manufactured in the neighbourhood of Otaru in Hokkaido. It has been said that experimental studies on the improvement of the quality of canned crab had already been made by Mr. Shigeo SASA (later President of the Fisheries College of Hakodate, Hokkaido) who was a technologist of the Hokkaido Fisheries Experimental Station, at Kunashiri Island. Those studies were carried out under the presumption that it was a hopeful enterprise to make canned food with crab meat. At that time the crab meat was prepared in dried form only.

The results of Mr. SASA's experiments in those days showed that the freshness of crab meat influences the quality of the canned crab, and the catastrophe of the canned crab meat (eg. especially blackened crab meat) can be prevented by treatment with acetic acid or by covering with parchment paper. Afterward the number of makers of canned crab increased, but the quality of the goods was never good. In 1917 Tsutsumi Co. Ltd. (present Nichiro Gyogyo Co. Ltd.) first manufactured comparatively good quality canned crab, and then the quantity for export increased. Afterward in 1924 the Association of Packers of Canned Crab of Japan (Nippon Kani Kanzumegyo Suisan Kumiai Rengokai) was established to control the quality of the canned product; then the regulations for inspection the quality of canned crab were strengthened. By such means the quality of the canned crab was improved while the output was increased. It was worthy note in those days that the Association sponsored studies on the improvement of crab and inspector belonging to the Association assumed the leadership the packers. The quality of the canned crab became famous the world round.

In spite of the decrease in the catching of crab resultant from the losing of Saghalien and the Chishima Islands after the recent War, the number of canneries in operation in various parts of Hokkaido has increased. On account of the decrease in the catch it has become impossible to pack good crab meat selected from a larger amount of material as well as could be done in the old times. As the case stands at present the packers pack a small quantity of material leaving nothing over.

Such an abnormal packing causes deterioration in the quality of the canned crab and spoiled cans occur frequently. On account of this deteriorating, there are many packers who have been suffering a loss. It is unreasonable to expect to pack cans of good quality if unfresh crab meat is used as well as fresh meat. In recent years, experimental studies on canned crab have been thought to be so extensive as to leave nothing more. However there now arise some intricate points regarding canned crab differing from the old time,

and there are also pending questions.

In order to solve those questions the present authors have made various experiments on crab meat [*Erimacrus isenbeckii* (*Brandt*) and *Paralithodes camtschatica* (*Til*)] which are in commerce and wish to offer the results of those experiments for the use of the canning industry.

PART I. ON THE MANUFACTURE OF CANNED CRAB FROM *Erimacrus isenbeckii* (*Brandt*)

Report 1. THE RELATION BETWEEN THE FRESHNESS OF RAW CRAB MEAT MATERIAL AND THE QUALITY OF THE CANNED PRODUCT

1. ON THE VELOCITY OF AUTOLYTIC DECOMPOSITION OF MEAT OF *Erimacrus isenbeckii*

Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Morihisa KIMURA

The muscle fiber of *Erimacrus isenbeckii* is more fine than that of *Paralithodes camtschatica*; the taste of the former is plain. The velocity of loss in freshness is also high. It is impossible to pack good quality cans with crab meat which has become unfresh. On the velocity of autolytic reaction of crab meat, ŌYA[1] has studied with the suspension of the meat of a kind of crab, *Chonoecetes opilio* (*O. Fabricus*); he has found that the value of the reaction velocity constant is almost the same until 5 days at 37°C. Thereafter the value of the constant decreases gradually. There is no study on the velocity of autolytic reaction of the meat of *Erimacrus isenbeckii* and *Paralithodes camtschatica*.

The authors have determined the amount of amino acid nitrogen when the meat is left at various temperatures and they have calculated the reaction velocity constant, temperature constant and temperature coefficient.

1. Sample and Experimental method.

Several number of merus of the ambulatory leg of *Erimacrus isenbeckii* (sloughed, male, 2 hours after catching) which was caught at the shore of Oshamambe, Hokkaido was wrenched from the body; the meat was taken off from the crust and put in toluene. The samples were brought to the laboratory as soon as possible. Then the samples were separated into three groups, and these samples were put into fresh toluene and stored aerobically at 4°±1°C, 25°±1°C and 35°±1°C. At definite intervals, those samples respectively were taken for the determination of the amount of amino acid nitrogen by Pope-Steven's method. In sampling about 30 gm of the respective samples were taken on the dried filter paper. After the toluene had dripped from the meat, a definite amount of the sample was taken without pressing it. As control some pieces of merus of the ambulatory leg were brought to the laboratory without pressing. As control some pieces of merus of the ambulatory leg was brought to the laboratory without antiseptizing with toluene; they were aerobically stored at 25°±1°C.

At definite intervals these samples were quantitatively analyzed for the amount of amino acid nitrogen and volatile base nitrogen. The moisture content of the raw sample was

74.32%; the total nitrogen was 3.2%, that is to say 20% of protein; and the amino acid nitrogen produced by hydrolysis of the protein with hydrochloric acid was 2.184%.

In the autolytic decomposition of the meat muscle, the autodigestion velocity constant may be calculated from a monomolecular chemical reaction by use of the following equation (1)

$$K = k \times 0.4343 = 1/t \log a/a-x \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \quad (1)$$

In equation (1), K (or $k \times 0.4343$) is the autodigestion velocity, "t" is time until which the amount of amino acid nitrogen in the meat was determined, "a" is the total amount of amino acid nitrogen which was produced from the original substrate by the hydrolysis with hydrochloric acid, "x" is the increasing amount of amino acid nitrogen at every time of determination. The temperatures of the determination were 4°C, 25°C and 35°C, so temperature constant and temperature coefficient (Q_{10}) in the autloysis of crab meat could be calculated. For calculating temperature constant and temperature coefficient, Arrhenius' equation was employed after the manner of ŌYA's experiment as follows:

$$K_2/K_1 = e^{\frac{A}{R}\left(\frac{1}{T_1}-\frac{1}{T_2}\right)} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \quad (2)$$

In equation (2), K_1 and K_2 are autodigestion velocity constants which were calculated respectively at the temperatures of determination, T_1 and T_2 °K after a definite time, R is gas constant (1.985 kcal), A is temperature constant.

2. Experimental Results and Discussion.

Results obtained are given in Table 1. In the Table the time of determination is shown by the time elapsed since the catching. The relation between the amounts of amino acid nitrogen or volatile base nitrogen and the time elapsed is shown in Fig. 1.

Table 1. Changes of the amounts of amino acid nitrogen and volatile base nitrogen in the autolytic decomposition of the meat of *Erimacrus isenbeckii*.

Samples	The meat antiseptized with toluene.			Control (The meat without antiseptized with toluene)	
Temp.	4° ± 1°C	25° ± 1°C	35° ± 1°C	25° ± 1°C	
Time elapsed \ Components	Amino acid-N	Amino acid-N	Amino acid-N	Amino acid-N	Volatile base-N
7 (hrs.)	223mg%	223mg%	223mg%	223mg%	15mg%
10	225	240	246	263	20
15	227	253	295	281	24
20	229	265	329	316	34
25	233	274	338	349	55
30	238	279	341	388	74
40	252	286	344	490	140
50	268	290	347	393	224
60	281	293	348	394	236
70	289	296	349	382	240
80	294	298	350	—	—
90	294	298	350	—	—

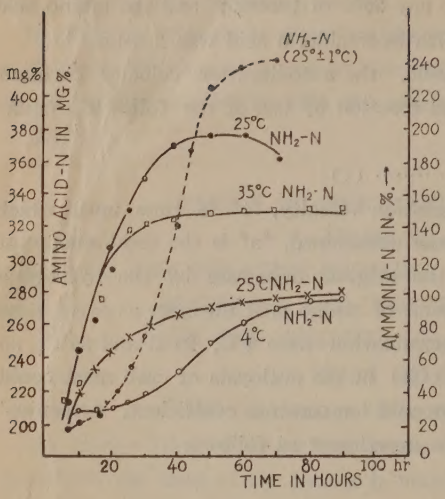


Fig. 1 Change of the amounts of Amino acid-N and Ammonia-N during Autocatalitic decomposition.

—— The meat antiseptized with toluene.

····· The meat without antiseptized with toluene.

From Table 1 where are shown the autodigestion velocity constants, by means of the amount of amino acid nitrogen, the values of $K\times10^6$ ($k\times10^6\times0.4343$) and of $\log a/a-x$ for antiseptized sample with toluene at every time of determination, "t", can be calculated. They are shown as in Table 2.

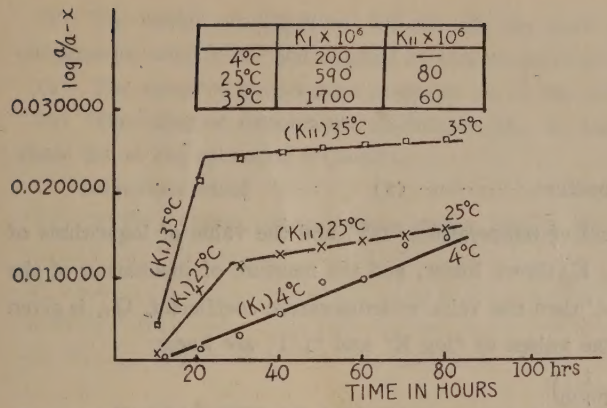
From the results obtained for the control sample which was without antiseptizing with toluene, autolytic reaction velocity constant is not calculated, because those results are applicable to the monomolecular autocatalytic reaction rather than to the monomolecular chemical reaction.

As clearly shown in Table 1 and Fig. 1 where are given the increasing amounts of amino acid nitrogen, the autodigestion velocity of the meat of *Erimacrus isenbeckii* increased with the rising of the temperature, and the maximum value of the velocity is

Table 2. Changes of the autodigestion velocity constants ($K\times10^6$) and of "log a/a-x" by the changes of temperature and time (hours) at the determination (the amount of total nitrogen 3.2%, a=2184mg%).

Temp. / Time	4° ± 1°C		25° ± 1°C		35° ± 1°C	
	log a/a−x	$K\times10^6$	log a/a−x	$K\times10^6$	log a/a−x	$K\times10^6$
10(hrs.)	0.0003	30	0.0034	340	0.0045	450
20	0.0013	65	0.0084	420	0.0216	1,080
30	0.0029	97	0.0112	373	0.0240	800
40	0.0057	142	0.0126	315	0.0247	617
50	0.0090	180	0.0135	270	0.0258	506
60	0.0096	160	0.0141	235	0.0256	427
70	0.0133	190	0.0145	207	0.0259	370
80	0.0142	178	0.0152	190	0.0260	325
90	0.0142	160	0.0152	170	0.0260	290

obtained after 70~80 hours' storage at 4°C, 40 hours' storage at 25°C, 20 hours' storage at 35°C. With the passage of time beyond that which shows the maximum values the values attained equilibrium. On the other hand, the produced amount of volatile base nitrogen attained to about 30 mg% after 80 hours when the meat was stored at 35°C. This fact shows that antisepsis with toluene may be in vain. The increase in amount of volatile base nitrogen is slight when the meat is stored at 25°C or 4°C.



	$K_1 \times 10^6$	$K_2 \times 10^6$
4°C	200	—
25°C	590	80
35°C	1700	60

Fig. 2 Relation between the value of "log a/a-x" and time "t"

But the increase in amounts of volatile base nitrogen and amino acid nitrogen is remarkable and the meat came to the state of incipient putrefaction after 10 hours when the unantiseptized meat was stored at 25°C.*

The relation between time, "t," and the value "log a/a-x" which is obtained from the data given in Table 2, is linear as shown in Fig. 2. And from this fact equation (1) is admitted right. In this case the value of autodigestion velocity constant, K, is manifested by a measure of inclination of the straight line. The line is straight at 4°C, and it is divided into two stages at 25°C and 35°C respectively.

If the autodigestion velocity constant of the first stage is K_1 and that of the second stage is K_2 the values of K_1 and K_2 are calculated as are given in Table 3.

Table 3. Relation between temperature and the autodigestion velocity constant.

Temp. \ $K \times 10^6$	$K_1 \times 10^6$	$K_2 \times 10^6$
4°C	200	——
25°C	590	80
35°C	1,700	60

As seen in Table 3 and Fig. 2, the value of $K_1 \times 10^6$ is 200 at 4°C in the sphere between 10~80 hours.

The value of $K_1 \times 10^6$ is 590 at 25°C until about 30 hours, then the value becomes 80 after 30 hours, that is to say the autodigestion velocity decreases very much. At a higher temperature, e.g. at 35°C, the value of $K_1 \times 10^6$ becomes 1,700 in 20 hours, then the value of $K_2 \times 10^6$ decreases to 60. That is to say, the initial autodigestion velocity increases with the rising of the temperature and reaches rapidly to equilibrium. This fact agrees with the properties of every line drawn in Fig. 1. In calculating of the temperature constant and the temperature coefficient of *Erimacrus isenbeckii*, as clearly shown in Fig. 2, the required time in which the initial autodigestion reaction constant ($K_1 \times 10^6$) reaches to equilibrium at 35°C is 20 hours. So the values of the autodigestion velocity constant at 20 hours were set as standard for every temperature of determination.

When equation (2) was changed to

* The authors know that the incipient stage of putrefaction of the meat of *Erimacrus isenbeckii* is 20 mg of volatile base nitrogen per 100 gm of the meat. This chemical reason will be described later. The limit of freshness for raw meat of *Erimacrus isenbeckii* for canned crab is 20 mg% of volatile base nitrogen.

$$K_2 e^{\frac{A}{R}\cdot\frac{1}{T_2}} = K_1 e^{\frac{A}{R}\cdot\frac{1}{T_1}}$$

then the above equation becomes

$$Ke^{\frac{A}{R}\cdot\frac{1}{T}} = \text{constant}$$

$$\log K + \frac{A}{R}\log e\frac{1}{T} = \text{constant} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \quad (3)$$

The relation between the reciprocal of temperature, 1/T, and the value of logarithms of the autodigestion velocity constant, K, shows linear, and the measure of inclination of the straight line is shown as "A/R log e;" then the value of temperature coefficient, Q_{10}, is given as follows in the sphere in which the values of "log K" and "1/T" are linear.

$$Q_{10} = \frac{kt+10}{kt} = e^{\frac{A}{R}\left(\frac{1}{T}-\frac{1}{T+10}\right)}$$

Therefore the value of "Q_{10}" will be given from the following equation. (4)

$$\log Q_{10} = A/R \log e\,(1/T - 1/T+10) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \quad (4)$$

Table 4. Relation between $\frac{1}{T}$ and $\log K\times 10^6$

Temp. (t)	$\frac{1}{T}$	$\log K\times 10^6$
4°C	0.00361	1.8129
25°C	0.00336	2.6138
35°C	0.00325	3.0338

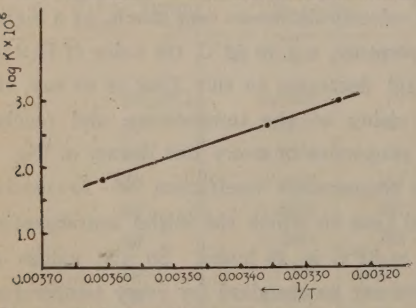


Fig. 3. Relation between the value of "log $K\times 10^6$" and time "t"

The relation between the value of "1/T" and "log($K\times 10^6$)" at every temperature at 20 hours is shown in Table 4 and Fig. 3. From Fig. 3 the value of "A/R log e" which is a measure of inclination of the straight line is 3,350. Therefore the value of the temperature constant, A, in the case of autodigestion of *Erimacrus isenbeckii* is 15,311 at 4~35°C, and then the value of Q_{10} becomes 2.34. When Q_{10} is calculated from $K\times 10^6$ at 25°C and 35°C at 20 hours, the value of Q_{10} is given 2.57 from Table 2 and 2.88 from Table 3. The value of Q_{10} may then be given as about 2.6 on the average.

3. Summary

(1) In order to autodigest crab meat (*Erimacrus isenbeckii*), the meat was aerobically stored in toluene at about 4°C, 25°C and 35°C. The amount of amino acid nitrogen of the stored meat was estimated at certain definite intervals, and the change of the autodigestion velocity constant ($K\times 10^6$) by storing temperature and storing time, was observed.

(2) The values of $K\times 10^6$ are given as 200 at 4°C in the sphere of 10~80 hours, 590 at 25°C in 10~40 hours, 1,700 at 35°C in 10~25 hours. Thereafter the value of K decreased and attained equilibrium with the lapse of the storing time.

(3) The initial autodigestion velocity of the crab meat increased with the rising of temperature until 35°C, and reached rapidly to equilibrium.

(4) The value of temperature constant, A, in the autolysis of the crab meat was 15,311.

(5) The value of temperature coefficient, Q_{10}, in the autolysis of the crab meat was about 2.6 in the sphere of 0°C～35°C.

Literature cited

(1) T. ŌYA (1928) ; Suisan Gaku Kaiho, Vol. 5, No. 1

(水産科学研究所業績　第154号)

II. VELOCITY OF BACTERIAL DECOMPOSITION OF THE MEAT OF *Erimacrus isenbeckii*

Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Terushige MOTOHIRO

As stated in the previous part of this report autodigestion is influenced by the increase in the storing temperature up to a certain limit of the temperature. To prevent the autodigestion of the crab meat, it is customarily boiled as soon as it is brought into the cannery after being landed from the fishing boat. In fishing boat the crabs are removed from the nets and the carapaces removed together with the liver in which active protease is contained. Therefore, the deterioration of the crab meat in the cannery is dependent upon the action of bacteria which contaminates the meat after the boiling.

KANEKO[1] has stored the boiled crab meat and calculated the temperature coefficient in the bacterial decompostion of the meat by estimating the incipient spoilage not by quantitative determination of the chemical products in the decomposed meat, but by organoleptic detection.

The authors have aerobically or anaerobically stored the boiled crab meat and control meat (unboiled leg meat and shoulder meat) with and without crust at 4°C, 25°C and 35°C, and estimated quantitatively the volatile base nitrogen at certain definite intervals. Canned crab meat was also employed in another lot of samples. From the change of the amount of volatile base nitrogen, the bacterial decomposition velocity constant was calculated. Values of temperature coefficient and temperature constant at different storing temperatures were also calculated. Thus the relation between bacterial decomposition of crab meat and storing temperature was ascertained.

1. Experimental samples.

In this experiment the crab meat (*Erimacrus isenbeckii*) was treated in the form of 16 kinds of sample as follows;

(i) Samples of raw meat, removed from the crust and ground.

Sample-A ····· Raw meat (shoulder and leg meat), ground and stored aerobically at 4° ± 1°C.

Sample-B ····· Treated as above and stored aerobically at 24° ± 2°C.
Sample-C ····· Treated as above and stored aerobically at 35° ± 2°C.
Sample-D ····· Treated as above and stored anaerobically at 24° ± 2°C.

(ii) Samples of boiled meat removed from the crust (shoulder and leg meat)

Sample-E ····· Boiled meat, stored aerobieally at 4° ± 1°C.
Sample-F ····· Boiled meat, stored aerobically at 24° ± 2°C.
Sample-G ····· Boiled meat, stored aerobically at 35° ± 2°C.
Sample-H ····· Boiled meat, stored anaerobically at 24° ± 2°C.

(iii) Canned meat (shoulder and leg meat from which meat juice had been removed)

Sample I ····· Canned meat taken out of cans, stored aerobically at 22°C ± 2°C.
Sample-J ····· The same material, stored anaerobically at 24° ± 2°C.

(iv) Samples of raw meat with crust.

Sample K ····· Round body meat without removal of carapace, stored aerobically at 23° ± 1°C, shoulder meat only was used.
Sample L ····· Treated as above, stored aerobically at 23° ± 1°C, leg meat only used.
Sample-M ····· After removal of carapace, stored aerobically at 23° ± 1°C without washing, shoulder meat only used.
Sample O ····· Round body meat without removal of carapace, stored aerobically at 35° ± 1°C, both shoulder and leg meat used.
Sample P ····· After removal of carapace, boiled and stored aerobically at 35° ± 1°C with crust, both shoulder and leg meat were used.

For the sample materials, *Erimacrus isenbeckii* was caught off the shores of Abuta and Oshamambe, Hokkaido several times between the end of July and early September 1952. The freshness of the crab meat was good.

Samples of groups (i) and (ii) were immediately removed from carapace and viscera at landing field, and brought to the laboratory in ice within 4 hours. At the laboratory the shoulder and leg meat were washed with sterilized water. The meat was stored as raw meat or as boiled meat. The samples which were stored aerobically were put flat on the dish and placed at the respective temperatures. The samples which were stored anaerobically were put in large test tube in 50 gm portions and sealed by melted vaselin on the meat, thus being cut off from the air; then the test tube was plugged with gum. The sample of canned meat sample (iii) was packed as raw crab meat and processed as usual.

2. Method of Experiment.

The amount of volatile base nitrogen in raw samples was quantitatively determined at certain definite intervals from the time of catching as the starting point in the raw sample, from the time of boiling in the boiled sample and from the time of opening of can in the canned meat.

3. Results of Experiments.

To calculate the bacterial decomposition velocity constant (the volatile base producing

velocity constant), equation (5) of the monomolecular autocatalytic chemical reaction to volatile base accumulation was applied after KIMATA[2] and YAMAMURA[3]

$$\log y/A-y = Kt + C \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (5)$$

In equation (5), "y" is the increasing amount of volatile base, "A" is the maximum amount of volatile base produced, "t" is time from the starting point until the estimation of the amount of volatile base (hrs.), "K" is volatile base producing velocity constant. "C" is a constant.

From equation (5) the relation between the value of "log y/A-y" and time, "t," is manifested by a straight line, and from the measure of inclination of the line the value of "K" is determined. If "t_1" is time at which the reaction is half completed, then "t_1" is obtained by the following equation (6)

$$\log y/A-y = K(t-t_1) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (6)$$

The temperature constant "A", and the temperature coefficient "Q_{10}" in the bacterial decomposition of the meat of *Erimacrus isenbeckii* were obtained by equation (3), (4) derived from Arrhenius' equation (2) as in the previous Report from the data which were estimated at various storage temperatures for the same samples.

In equation (2) K_1 and K_2 is the volatile base producing velocity constant respectively at T_1 and at T_2. R is gas constant (1.985 Kcal). A is temperature constant.

For every sample, the amounts of volatile base nitrogen were estimated at certain intervals; the obtained experimental data are shown in Table 1.

From Table 1 the relation among the amount of volatile base nitrogen produced, storing temperatures and storing time in the aerobic bacterial decomposition for the raw crab meat (A-, B- and C- sample) and boiled crab meat (Samples E, F and G) are shown in Fig. 1. In Fig. 2 are shown the differences of the amounts of volatile base nitrogen produced at almost the same temperatures as in above experiments for raw crab meat (Samples B and D) and boiled crab meat (Samples F and H) under aerobic and anaerobic storing conditions. Fig. 3 exhibits the data from crab meat with crust (Samples K, L, M, N, O and P).

In the same Fig. the curves for Samples B, C and G are also shown as control.

By applying equations (5), (4) and (3) to experimental results, the writers obtained the bacterial decomposition velocity constant "$K \times 10^3$", the temperature coefficient "Q_{10}", and the temperature constant "A" in the bacterial decomposition were calculated. Besides those data, time, "t_1," at which the reaction is half completed, and time, "t_{20}," at which the amount of volatile base nitrogen produced in crab meat reached to 20 mg%, are shown in Table 2.

The reason for evaluating "t_{20}" is that 20 mg% of the amount of volatile base nitrogen produced in crab meat (*Erimacrus isenbeckii*) is the approvable limit of freshness as raw material for canned crab meat as later stated.

4. Discussion

(1) Difference of values of bacterial decomposition velocity as caused by different storage temperatures.

Table 1. The changes in the amount of volatile base nitrogen (mg%) when samples were stored under different conditions.

Samples / Time (hrs.)	Samples of raw meat, removed from the crust and ground (Shoulder and leg meat).				Samples of boiled meat, removed from the crust (Shoulder and leg meat).				Canned meat (Shoulder and leg meat).		Samples of raw meat with crust.						Remarks
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
0	6	12	6	12	9	10	8	6	17	5	—	—	—	—	—	—	Components of the sample.
5	—	—	—	—	—	—	11	—	—	—	—	—	—	—	2	7	
10	7	17	22	—	—	—	—	12	20	7	10	4	8	6	9	11	
15	—	24	69	—	—	—	45	29	—	11	18	7	13	10	47	18	
20	11	34	122	24	10	15	102	49	22	—	32	10	19	15	84	25	
25	—	50	172	33	—	57	—	109	44	24	—	—	—	—	90	38	
30	18	74	220	51	—	127	172	140	94	46	64	24	33	24	—	57	
35	—	103	234	75	—	—	186	—	132	71	—	—	—	—	—	—	
40	32	140	242	104	13	137	207	147	154	89	78	49	53	37	—	114	
45	80	193	245	134	—	—	207	—	162	94	—	—	—	—	—	128	
50	103	224	246	159	—	142	—	149	163	95	86	65	82	60	—	130	
55	—	234	—	174	—	—	—	151	—	—	—	—	—	—	—	—	
60	103	236	—	182	17	144	—	159	—	98	90	76	126	95	—	—	
65	—	—	—	184	—	—	—	174	—	—	—	—	—	—	—	—	
70	—	240	—	186	—	145	—	189	—	92	92	84	150	144	—	—	
80	—	—	—	—	23	—	—	—	—	—	93	90	170	159	—	—	
100	—	—	—	—	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
120	—	—	—	—	47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
135	—	—	—	—	75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
150	—	—	—	—	90	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Sample No.	Water content %	Total nitrogen %
A, D	78.4	3.0
B, C	77.2	3.0
I	80.5	2.8
J	80.6	2.8
K	77.7	3.3
L	77.7	2.8
M	75.9	3.7
N	74.3	2.5

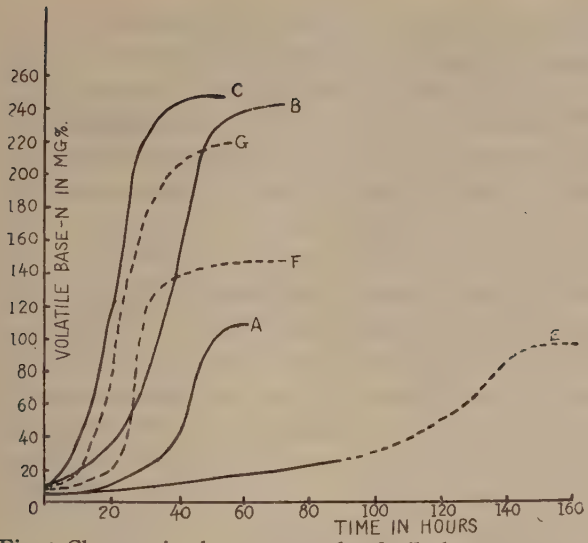


Fig. 1 Changes in the amount of volatile base nitrogen produced from raw and boiled crab meat at various storage temperature.

As shown in Fig. 1 and Table 2, the velocity of bacterial decomposition of *Erimacrus isenbeckii* is rapid with the rising of temperature within the definite limit of temperatures, therefore the amount of chemical products (volatile base) from the sample becomes larger and the value of the bacterial decomposition velocity constant ($K \times 10^3$) also becomes larger with the increase of temperature. On the contrary, the values of "t_1" and "t_{90}" not much influenced by the rising of temperature, that is to say, the progress of the decomposition is clearly rapid, in a short time, in the case of higher temperature.

(2) Difference of values of bacterial decomposition velocity found in samples stored under aerobic and anaerobic conditions.

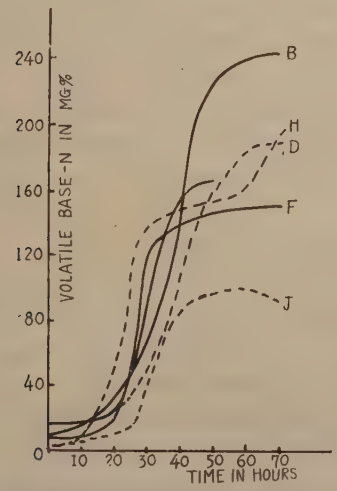


Fig. 2 Changes of the amount of volatile base nitrogen produced in various samples under different storage conditions (aerobically and anaerobically.)

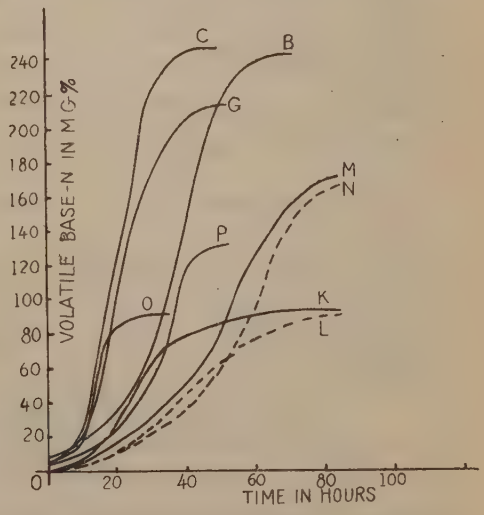


Fig. 3 Changes in the amount of volatile base nitrogen in the course of bacterial decomposition of crab meat with crust.

Table 2. Bacterial decomposition velocity constant, temperature coefficient, temperature constant at various storage conditions.

Kinds of samples and putrefactive conditions.	Storing temperature. (°C)	$K \times 10^3$	t_1 (1)	t_{20} (2)	Temperature coefficient "(Q_{10})" and temperature constant "A."
A. Raw meat, shoulder and leg meat, aerobically	4±1°C	53	48	30	Raw crab meat.
B. Treated as above and stored aerobically.	24±2°C	74	373	12	4~35°C
C. Treated as above and stored aerobically.	35±2°C	91	20	5.5	$Q_{10}=1.2$, $A=2,910$
D. Treated as above and stored anaerobically.	24±2°C	71	39	15	
E. Boiled meat, stored aerobically.	4±1°C	55	88	70	Boiled crab meat.
F. Boiled meat, stored aerobically.	24±2°C	108	26	20	At the range of temp. 4~25°C
G. Boiled meat, stored aerobically.	35±2°C	103	22.5	9	$Q_{10}=1.4$, $A=6,000$
H. Boiled meat, stored anaerobically.	25±2°C	99	21.6	12	
I. Canned meat taken out of cans, stored aerobically.	22±2°C	111	30	20	
J. The same material, stored anaerobically.	24±2°C	91	30.9	26.5	
K. Round body meat without removal of carapace, stored aerobically, shoulder meat only was used.	23±1°C	55	28.3	16	When the sample which round body meat without removal of carapace was used.
L. Treated as above, stored aerobically, leg meat only used.	〃 〃	44	41.7	27	
M. After removal of carapace, stored aerobically without washing, shoulder meat only.	〃 〃	43	48.4	21	$Q_{10}=1.8$, $A=11,050$
N. Treated as sample-M, leg meat only used.	〃 〃	41	55.1	25	
O. Round body meat without removal of carapace, both shoulder and leg meat.	35±1°C	105	148	11.5	
P. After removal of carapace, boiled and stored aerobically, both soulder and leg meat.	〃 〃	74	28.2	17.5	

Note : (1) The time at which the reaction is half completed.
(2) The time at which the amount of volatile base nitrogen of sample meat reached to 20 mg %.

As shown in Fig. 2 the progress of decomposition in the case of aerobic decomposition of raw meat and canned meat is more rapid than in the case of anaerobic decomposition, and the amount of decomposed products of the former is much greater than that of the latter.

There is little difference however between the values of bacterial decomposition velocity constant of aerobic storing and anaerobic storing.

(3) Difference of values of bacterial decomposition velocity as caused by different treatments of the meat (raw, boiled and canned crab meat): In aerobic storing condition, boiled meat decomposed later than does raw meat, but when the bacterial decomposition reacted to the lag period of the decomposition, the boiled meat decomposed more rapidly than the raw. For example, in the samples stored at 35°±2°C the value of "$K \times 10^3$" of the raw meat was 91 and of boiled meat 103; the value of "t_1 (or t_{90})" for raw meat was 20 hours (or 5.5 hours) and that for boiled meat was 22.5 hours (or 9 hours). The aerobic or anaerobic bacterial decomposition velocity constant "$K \times 10^3$" of canned crab meat were together large; this meat is decomposable more rapid than raw meat of boiled meat. Therefore canned crab meat must be eaten immediately after the opening of the can. In anaerobic storing the value of the bacterial decomposition velocity constant of boiled meat is larger than that of raw meat, and the former attained more rapidly the lag period of the decomposition than the latter.

(4) Difference of bacterial decomposition velocity as influenced by storing of sample with or without crust: As shown in Fig. 3 and Table 2 the leg meat with crust decomposed later than the meat which is removed from the crust in storage. This is the reason why the former is little contaminated by bacteria. Therefore in the canning of crab meat the boiled meat must be prepared immediately after the removing from the crust. When the shoulder meat and leg meat were compared, the former decomposed more rapidly than the latter in the storing with or without crust. The reason why this is true is that the shoulder meat is close to the liver which is in the carapace, so the liver enzyme may act upon the shoulder meat. The boiled shoulder and leg meat decomposed later than the raw shoulder and leg meat, but when the bacterial decomposition of the boiled meat began, the progress of the decomposition was more rapid than that of the raw meat. In this case the shoulder meat decomposed more rapidly than the leg meat.

(5) Temperature coefficient and temperature constant in the bacterial decomposition of sample meat.

The value of temperature coefficient, "Q_{10}," of raw ground crab meat was 1.2 and the value of temperature constant, "A," was 2,910 in the limit of temperature 4°~35°C; for boiled crab meat "Q_{10}" was 1.4 and "A" was 6,000. The value of "t_{90}" of boiled meat was larger than those of the raw meat at various temperatures, that is to say, the boiled meat decomposes later than the raw meat, but when the bacterial decomposition of the boiled meat has once begun, the progress of the decomposition is more rapid than that of the raw meat. In case of the storage of raw crab meat with crust, the value of "Q_{10}" was 1.8 and the value of "A" was 11,050. In this case the value of "t_{90}" of boiled meat was larger than the raw meat, that is to say, the boiled meat took a longer time than raw meat to reach the incipient spoilage stage, but when the boiled meat began the bacterial decomposition, the progrss of the decomposition was rapid.

5. Summary

Sample of raw crab meat (*Erimacrus isenbeckii*), boiled meat, canned meat which were removed from the crust and round body with crust were stored aerobically or anaerobically at various temperatures. The amount of volatile base nitrogen for those stored samples was estimated quantitatively ; the bacterial decomposition velocity was compared and the following conclusions were obtained.

(1) The bacterial decomposition velocity of crab meat (*Erimacrus isenbeckii*) was rapid with the rising of the temperature within the temperature limits 4°～35°C.

(2) The bacterial decomposition velocity of crab meat under conditions of aerobic storing was more rapid than that under anaerobic storing.

(3) Boiled crab meat decomposed later than raw meat, but when the spoilage began, the velocity of the decompsition became rapid.

(4) Canned crab meat decomposed more rapidly than raw meat or boiled meat.

(5) Raw or boiled crab meat with crust decomposed later than the raw or boiled which were removed from the crust. But in this case the boiled meat decomposed later than the raw meat which was as well found to be true in previous experiments.

(6) Shoulder meat decomposed more rapidly than leg meat.

(7) The temperature coefficient in the bacterial decomposition, Q_{10}, of raw meat is 1.2 (within the limit of temperature 4°～35°C), that of boiled meat is 1.4, that of the raw meat with crust is 1.8.

(8) The temperature constant, A, of the raw meat is 2,910 (within the temperature limits of 4°～35°C), that of boiled meat is 6,000 (within the temperature limits of 4°～25°C), that of raw meat with crust is 11,050.

Literature cited

(1) KANEKO (1952) : The Canners Journal. (Kanzume Jiho), Vol. 31, No. 7. p. 78

(2) KIMATA (1941) : J. Imp. Fish. Inst., Vol. 34, No. 2, p. 116

(3) YAMAMURA (1937) : Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., Vol. 6, No. 3, p. 141

（水産科学研究所業績　第155号）

III. DISCUSSION OF METHODS FOR DETERMINING THE FRESHNESS OF MEAT OF *Erimacrus isenbeckii*

Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Terushige MOTOHIRO

At the time of processing of canned crab, it is very important to treat the crab meat on the basis of judgement of freshness of raw material of the meat. For example, from the freshness of the meat the processing time to be completed may be concluded. There are many methods of determining the freshness of fish meat.

The authors wished to find an adequate method for that purpose in the case of crab meat, accordingly they conducted experiments as described and discussed below.

1. Experimental Method

The samples employed in this experiment were like those in the previous report.

Those of (i) Samples of raw meat which was removed from the crust and ground (Samples A, B and C), (ii) Samples of boiled meat which was removed from the crust (Samples E, F, G, and H), (iii) Canned meat (Samples I and J), (iv) Samples of raw meat with crust (Samples K, L, M and P) were stored under the various described conditions, and estimated chemically, bacteriologically and organoleptically. The results obtained were almost the same as in the earlier report. Here, the authors wish to discuss the results obtained from Samples B, D, K, L, M and N.

Sample B ····· Raw meat (shoulder, leg meat) ground and stored aerobically at 24° ± 1°C.

Sample D ····· Treated as above and stored anaerobically at 24° ± 1°C.

Sample K ····· Round body meat without removing of carapace stored aerobically at 23° ± 1°C; shoulder meat only was used.

Sample L ····· Treated as above, and was stored aerobically at 23° ± 1°C; leg meat only was used.

Sample M ····· After removing of carapace, stored aerobically at 23° ± 1°C without washing; shoulder meat only was used.

Sample N ····· Treated as above, stored aerobically at 23° ± 1°C; leg meat only was used.

The items of estimation for detecting freshness of crab meat are as follows:

(i) Moisture ····· By usual drying method (drying temperature, 95°~100°C).

(ii) Volatile base nitrogen ····· After Weber and Wilson's method (140mm Hg, distilling temperature 45°~55°C, time 40~50 minutes).

(iii) Water soluble matter nitrogen ····· Ten gm of the sample was added with distilled water to 100 c.c. in measuring flask and stored for 40 minutes; after extraction the extract was filtered, the nitrogen of the definite volume of the filtrate was estimated after the micro Kjeldahl method.

(iv) Total nitrogen ····· Five tenths gm of the sample was estimated after the micro Kjeldahl method.

(v) Amino acid nitrogen ····· After Pope Steven's method.

(vi) Hydrogen ion concentration ····· The extract of the meat with 10 times volume of distilled water was estimated by Toyo pH-paper.

(vii) Walkiewicz's reaction ($HgCl_2$-reaction) ····· After Amano's method.

(viii) Eber's reaction ····· Put Eber's reagent into the test tube and then the small pieces of the sample reaching to the surface of the reagent in about 0.5 cm space. The degree of generation of white smoke was judged. If white smoke is clearly seen, the sign is +, if a little white smoke is seen, the sign is ±, and no smoke is −.

(ix) Turbidity ····· Extracted solution with 10 times amount of the distilled water from

Table 1. Raw crab meat stored aerobically at 24° ± 1°C.

Time elapsed (hrs.)	Water content (%)	Volatile base-N (mg%)	Water soluble-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	pH		W-reaction		Eber's re-action	Tur-bidity	Bacterial number	Colour	Odour
					Meat extra-ctant		A soln.	B soln.					
0	77.2	12	0.41	153	—	—	±	+	+	±	—	—	Fresh fish smell
10	—	17	0.43	171	6.4	6.6	+	+	+	±	34×10^3	Pinkish white	〃
15	—	24	0.44	221	—	—	+	+	+	+	—	〃	Putrefactive odour
20	—	34	0.48	256	—	—					—	—	〃
25	77.2	50	0.53	273	6.5	6.8	+	+	++	+	125×10^3	Dark pink	〃
30	77.0	74	0.70	308	7.0	7.0	+	+	++	++	108×10^5	↓	↓
35	—	103	0.88	324	—	—					—	Darkish white	Strong putrefactive odour
40	76.9	140	0.97	330	7.4	7.0	++	+	++	++	133×10^6		
45	—	193	1.33	332	—	—					—	—	
50	77.0	224	1.86	333	7.4	7.2	++	+	++	++	$1,200 \times 10^6$		
55	77.0	233	1.13	331	7.4	7.2	++	+	++	++	37×10^6		
60	—	236	1.14	334	—	—					—	↓	↓
70	77.2	240	1.13	329	—	—					—		

the sample was organoleptically observed. Apparently transparent solution is indicated −, apparently turbid solution is +, and out of judgement is ±.

(x) Bacterial number ····· Plate culture calculation was used.

(xi) Organoleptic examination···Color and smell of the sample were organoleptically observed.

2. Results of Experiments and Discussion.

Using above described experimental methods the results obtained from raw crab meat which had been stored aerobically and anaerobically at 24° ± 1° were as follows.

From Tables 1 and 2 the changes of amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen, water soluble matter nitrogen, moisture content and the hydrogen ion concentration may be shown as in Figs. 1 and 2. The change of bacterial number in raw crab meat stored is shown in Fig. 3.

As shown in Figs. 1 and 2, the amount of volatile base nitrogen in raw crab meat stored aerobically or anaerobically at 24°±1°C increased with the elapse of time of storage and reached apparent-

Table 2. Raw crab meat stored anaerobically at 24° ± 1°C.

Time elapsed (hrs.)	Water content (%)	Volatile base-N (mg%)	Water soluble-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	pH		W-reaction		Eber's reaction	Turbidity	Bacterial number.	Colour	Odour
					Meat	extractant	A soln.	B soln.					
0	77.2	12	0.41	151	—	—	±	+	+	+	—	—	Fresh fish smell
10	—	16	0.42	162	6.4	6.6	±	−	+	±		Pinkish white	〃
20	—	24	0.50	193	—	—	+	+	+	+	29×10^3	〃	〃
25	77.1	33	0.59	219	6.8	6.8	+	+	++	+	—	Dark pinkish white	Putrefactive odour
30	77.6	51	0.70	259	7.0	6.8	+	+	++	+	358×10^3	—	—
35	—	75	0.84	289	—	—	—	—				—	↓
40	77.6	104	1.09	306	7.2	7.0	+	+	++	++	$1,500\times10^3$	Darkish white	Strong putrefactive odour
45	—	134	1.20	313	—	—					—	—	
50	77.6	159	1.22	316	7.4	7.0	++	+	++	++	10.2×10^6	—	
55	77.8	174	1.19	318	7.4	7.2	++	++	++	++	—	—	
60	—	182	—	319	—	—					162×10^6	—	—
65	—	184	—	311	—	—					837×10^6	—	↓
70	77.8	185	—	320	—	—							

ly to equilibrium after 40～50 hours.

The changes in the amounts of amino acid nitrogen and water soluble matter nitrogen are almost the same as the change of the amount of volatile base nitrogen in the initial storage period, but in the later period of storage the chages are irregular. Generally the increase in amounts of the amino acid nitrogen and of water soluble matter nitrogen are irregular in all periods of storage as observed in raw meat with crust. The amount of moisture-content decreased somewhat in the initial period of the storage and increased apparently with the period of decomposition in accordance with the increasing of volatile base nitrogen after 30～40 hours. The value of pH increased from the initial period, that is to say the value of pH was 6.4～6.6 in fresh meat, but when the decomposition reached equilibrium, the value of pH had changed to 7.2～7.4.

Next, as seen in Fig. 3 the increasing of bacterial number was logarithmically rapid in 40～50 hours of the period from the initial decomposition to equilibrium, while after 50 hours the bacterial number decreased. As seen

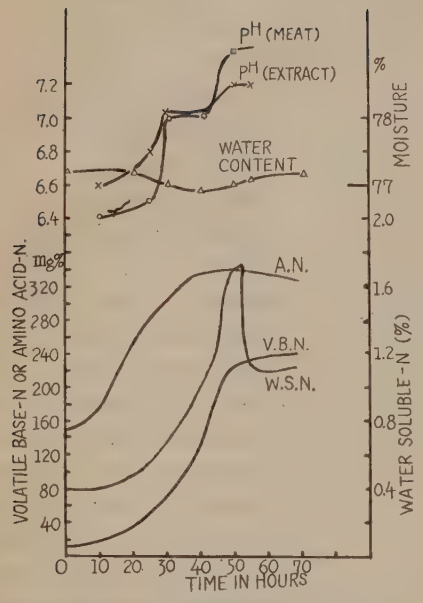


Fig. 1 The chemical changes of raw crab meat stored aerobically at 24°±1°C.
A.N.=Amino acid nitrogen, V.B.N.=Volatile base nitrogen, W.S.N.=Water soluble nitrogen.

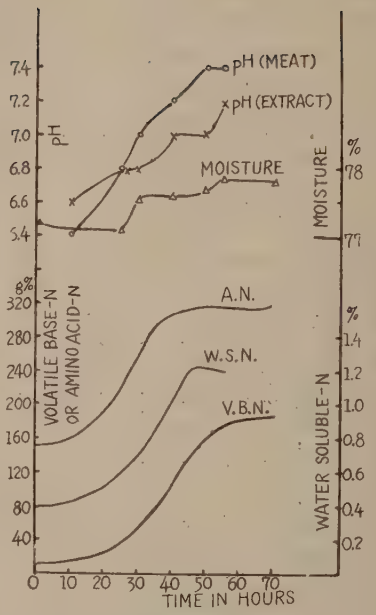


Fig. 2 The chemical changes of raw crab meat stored anaerobically at 24°±1°C.
A.N.=Amino acid nitrogen, V.B.N.=Volatile base nitrogen, W.S.N.=Water soluble nitrogen.

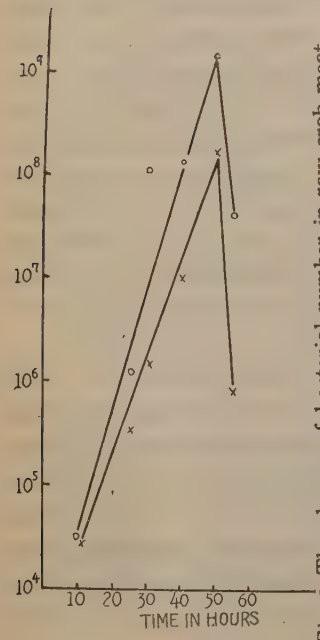


Fig. 3 The change of bacterial number in raw crab meat stored aerobically and anaerobically at 24°±1°C.
○—○ Raw crab meat stored aerobically at 24°±1°C.
×—× Raw crab meat stored anaerobically at 24°±1°C.

from the data in Tables 1 and 2, the result of detecting by W-reaction was that A-solution was ± and B-solution was + even when the raw crab meat was fresh, but the freshness of this meat will conflictingly be in the stage of incipient spoilage according to Amano's method. By Eber's reaction the raw meat was also found to be unfresh although the meat would generally be considered fresh.

The turbidity increased with the progress of the decomposition, that is to say the freshness was lost. When the amount of volatile base nitrogen reached to the range of 15~20 mg% in raw crab meat, the turbidity was signed +.

In comparing the amount of volatile base nitrogen

Table 3. The chemical changes of shoulder and leg parts of round crab body at 23°±1°C.

	Shoulder meat (Water content 77.69%, Total-N 3.35% / Total-N per dried matter 15.01%)							Leg meat (Water content 77.68%, Total-N 2.86% / Total-N per dried matter 12.81%)						
Time elapsed (hrs.)	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	Water soluble-N (%)	Bacterial number	pH	W-reaction A soln.	W-reaction B soln.	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	Water soluble-N (%)	Bacterial number	pH	W-reaction A soln.	W-reaction B soln.
10	9	—	—	—	—	+	+	4	—	—	—	—		
15	18	216	1.45	3.1×10^5	6.4	++	+	6	89	1.36	5.5×10^5	6.3	+	+
20	32	115	0.86	—	—	++	++	10	—	—	—	—		
30	64	173	1.30	1.6×10^6	7.4	++	++	24	57	1.58	2.7×10^6	7.2	+	+
40	78	—	—	3.2×10^6	7.6	++	++	49	161	0.73	2.8×10^6	7.8	/	/
50	86	115	1.08	2.1×10^7	7.6	/	/	65	—	—	—	—	/	/
60	90	74	1.64	4.6×10^7	/	/	/	76	167	1.01	5.6×10^7	7.7	++	++
70	92	—	—	—	/	/	/	84	98	1.67	4.2×10^7	—	++	++
80	92	127	1.21	—	/	/	/	90	153	0.67	—	—	++	++

Table 4. The chemical change of shoulder and leg meat which were removed from the crust after removing carapace (23°±1°C.).

	Shoulder meat (Water content 75.98%, Total-N 3.73% / Total-N per dried matter 15.53%)							Leg meat (Water content 74.32%, Total-N 2.51% / Total-N per dried matter 9.77%)						
Time elapsed (hrs.)	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	Water soluble-N (%)	Bacterial number	pH	W-reaction A soln.	W-reaction B soln.	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	Water soluble-N (%)	Bacterial number	pH	W-reaction A soln.	W-reaction B soln.
10	8	—	1.17	5.3×10^3	6.4	+	+	6	—	—	3.4×10^5	6.2	+	+
15	13	—	1.30	—	—	/	/	10	101	0.94	1.0×10^7	7.4	/	/
20	19	—	—	—	—	/	/	14	230	1.37	4.2×10^6	8.0	+	+
30	33	115	0.93	1.1×10^5	7.4	++	+	24	270	0.75	1.8×10^8	7.5	++	+
40	53	240	1.80	3.7×10^5	7.8	++	+	37	83	1.60	—	—	++	++
50	82	240	1.00	1.5×10^7	7.5	++	++	60	120	—	2.2×10^8	—	++	++
60	126	63	1.41	6.0×10^8	—	++	++	95	—	—	—	—	/	/
70	150	—	—	—	—	/	/	144	—	—	—	—	/	/
80	170	58	0.84	—	—	/	/	159	63	1.54	—	—	/	/

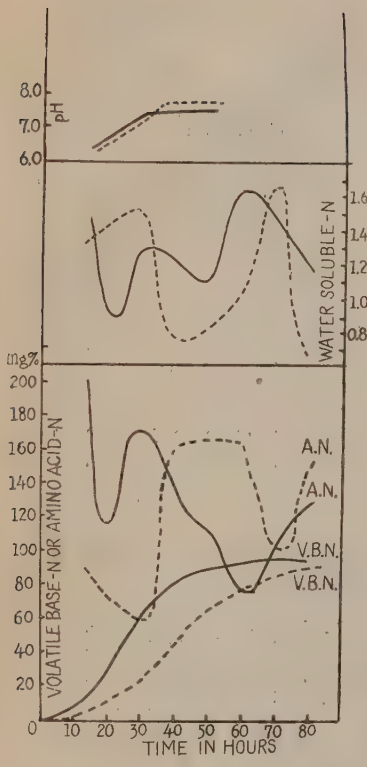


Fig. 4 The chemical changes of shoulder and leg parts of round crab body stored at 23°±1°C.
——Shoulder meat, ...Leg meat.
A.N.=Amino acid nitrogen, V.B.N.=Volatile base nitrogen.

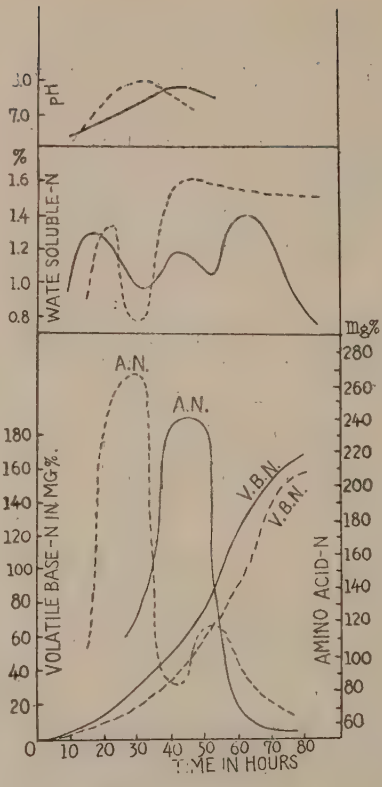


Fig. 5 The chemical changes of shoulder and leg meat with crust after removing carapace.
——Shoulder meat, ...Leg meat.
A.N.=Amino acid nitrogen, V.B.N.=Volatile base nitrogen.

and the organoleptic examination by the colour and smell of raw meat, when the amount of volatile base nitrogen reached to 20~25 mg%, the smell was noticeable; when the amount reached to 30 mg%, the spoilage smell was clearly realized, and the colour of the surface skin of the meat changed from pink to dark brown.

Table 3 shows the chemical change of shoulder and leg meat of round crab body stored at 23° ± 1°C.

Table 4 shows the chemical change of shoulder and leg meat which were removed from the crust after removing carapace.

From the data in Tables 3 and 4, the changes of the amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen, water soluble matter nitrogen and values of pH are graphed in Figs. 4 and 5. The change of bacterial number is shown in Fig.6.

As seen in Figs. 4 and 5, both samples showed almost the same change, that is to say, the amount of volatile base nitrogen increased comparatively irregularly, and then attained apparent equilibrium. In this case, the shoulder meat obviously decomposed is admitted to decompose more rapidly than the leg meat.

The changes of the amount of amino acid nitrogen and water soluble matter nitrogen

were complex, and indicated irregular increase and decrease. This is perphps due to non-uniform sampling of the part of crab body or to individual differences. Glycolytic action may also be one of the causes of irregular changes. But these causes are not all. Those irregular changes may not be useful as a method for estimating the freshness of raw crab meat. The change of value of pH increased gradually from the initial storage and showed in the range of 6.0~8.0.

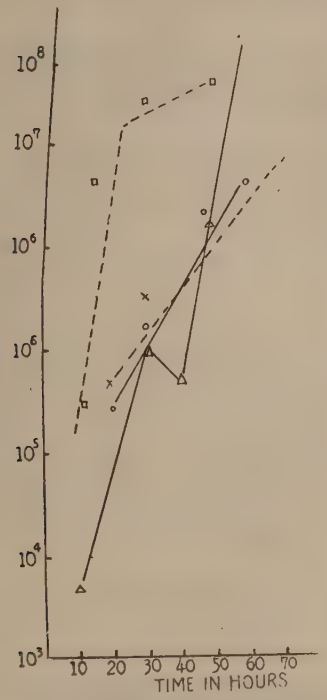


Fig. 6 The change of bacterial number of shoulder and leg meat of round crab body of those with sheath from which the carapace had been removed.

○——○ Shoulder meat of round body.
×·····× Leg meat of round body.
△——△ Shoulder meat stored after carapace removed.
□·····□ Leg meat stored after carapace removed.

As seen from Fig. 6 the bacterial number in the shoulder and leg meat of round body which was stored at 23° ± 1°C increased logarithmically until 60 hours storage when the amount of volatile base nitrogen reached equilibrium. The bacterial number in the shoulder meat stored with crust which was removed from the carapace increased logarithmically during the period from the initial decomposition to 20~30 hours, when the bacterial number once decreased and then increased logarithmically again. This is perhaps due to the fact that the change of bacterial number of the leg meat increased logarithmically up to 25 hours storage and then reached apparent equilibrium.

As seen in Tables 3 and 4, the detecting result using W-reaction indicated conflictingly that even the fresh sample was unfresh, so that this reaction is not useful for the detecting of the freshness of crab meat.

Judging from the results obtained with many chemical and organoleptic methods for detecting the freshness of crab meat, the method of estimation of volatile base nitrogen is the best, because the results obtained by this method agree with the organoleptic test and bacterial count.

3. Summary

As methods for detecting the freshness of crab meat which is raw material for canned crab, practical methods such as the estimation of the amounts of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen, water soluble nitrogen and value of pH, by the bacterial count, by determination of W-reaction and Eber's reaction and by estimation of turbidity were discussed in comparison with organoleptic determination.

The results obtained may be summarized as follows;

(1) The changes of the amount of amino acid nitrogen and water soluble matter nitrogen showed irregular increase and decrease. There was no remarkable value in such estimations for detecting the freshness of crab meat particularly in the stage of incipient spoilage.

(2) The change of the value of pH showed gradual increase, and reached to equilibrium with the lapse of time of decomposition. Therefore, it was difficult to detect the freshness of crab meat in the stage of incipient decomposition.

(3) The bacterial number in the raw crab meat increased logarithmically and reached equilibrium in the later period of spoilage; therefore it is difficult to detect the freshness of crab meat by the bacterial count in a short time.

(4) W-reaction was positive which indicates unfreshness even though the crab meat was known to be fresh. Therefore it is also unsuitable to detect the freshness of crab meat.

(5) The comment on Eber's reaction is as same as for W-reaction.

(6) The determination of turbidity was not very clear for detecting of freshness of crab meat.

(7) As a method for detecting freshness of crab meat, the estimation of the amount of volatile base nitrogen is the best. When the freshness of crab meat drops to incipient spoilage, the amount of volatile base nitrogen becomes 20 mg%, differing from the 30 mg% in the case of fish meat. This amount of volatile base nitrogen agrees with the result by organoleptic test, that is to say, when 20～25 mg% of the amount of volatile base nitrogen produced in crab meat, abnormal smell is noticeable, and when 30 mg% of the amount of volatile base nitrogen was estimated, the tainted smell was strong, the viscosity increased, and the color of the meat became dark brown.

（水産科学研究所業績　第156号）

IV. STUDIES ON THE INFLUENCES OF THE FRESHNESS OF RAW CRAB MEAT AND DURATION OF STORAGE AFTER BOILING UPON THE QUALITY OF CANNED CRAB MEAT

Eiichi Tanikawa, Yasunosuke Inoue and Minoru Akiba

The freshness of raw crab meat varies by fishing methods, such as catching by gill net, catching by basket, catching by a type of dredge net. Even if the carapace was removed from the crab body, and the crab leg and shoulder meat were immediately boiled, it sometimes happens that the boiled meat cannot be taken off from the crust and packed in cans because of the faulty management of the factory. In such cases, storing time and temperature after boiling influence the reduction in the freshness of meat. It is very important to know the limit of freshness of raw meat and boiled meat as raw material of canned crab meat. Kaneko[1)] has detected organoleptically the smell of shoulder and joint meat as a means to learn a standard of limit of freshness; he considered the time from boiling to the incipient spoilage which is in inverse proportion to the bacterial decomposition velocity

constant; then he devised a scale by which it is possible to calculate the maximum storing time at various temperatures after the boiling.

The present authors have stored raw crab meat which was caught and boiled after removing of carapace, and estimated the freshness by the determination of the amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen, the value of pH. Then they packed those crab meat samples having various degrees of freshness in can, and estimated the quality of the canned product.

1. Method of Experiment

Erimacrus isenbeckii which was caught off the shore of Oshamambe on August 28, 1952 was brought to the laboratory within 6 hours after catching. The bodies of crab were divided into two groups. From one of groups the meat was stored as it was at 35° ± 1°C. From the other group the leg and shoulder meat was boiled with crust after removal of carapace and then stored at 35° ± 1°C.

Crab meat loses freshness to a certain degree after the passage of a certain definite time. The freshness of the crab meat was detected by the estimation of volatile base nitrogen of the shoulder meat and leg meat. Thus the samples of crab meat showed 6 degrees of freshness, viz., the samples showing 5～10 mg% of volatile base nitrogen, 10～20 mg%, 30～40 mg%, 40～50 mg%, 50～60 mg% and 60～80 mg%. Each of 4 bodies of different degrees of freshness were respectively packed in cans as usual and stored about 3 weeks at 22°C (room temperature) and then open. The relation between the freshness of raw material or boiled material and the quality of canned crab meat was determined. The item of estimation were the amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen and value of pH for raw or boiled meat and organoleptic estimation such as the appearance, color, smell, blue meat, blackened meat and further, the amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen and value of pH of the juice of the canned crab.

2. Results of Experiments.

By previous experimental methods, the freshness of raw meat (shoulder and leg meat were estimated after leaving of crab body with carapace as it was) or boiled meat (shoulder and leg meat were estimated after leaving them with crust after removing carapace) was estimated. And estimated items are shown in Tables 1 and 2.

Table 1 shows the relation between the storing time and the freshness of samples (expressed by the amount of volatile base nitrogen). Table 2 shows the estimates of meat from sample cans.

3. Discussion.

As seen in Table 1 and Fig. 1, the velocity of increasing of the amount of volatile base in the boiled meat (after removing of carapace) is slower than that of raw sample. Therefore raw material must be boiled as soon as possible after the catching, and stored in a cool place until the processing. However, it may be impossible to treat raw material immediately after the catching according to circumstances. In such cases raw material must be stored in such low temperature (−3 ～ 0°C) that does not freeze the crab meat,

Table 1. The relation between the storing time and the freshness of samples (Changes of the amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen and value of pH).

Sample No.		Time elapsed (hrs.)	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	pH	Remarks
Raw crab meat, which stored with carapace.	R0	8	5.8	255	6.8	Normal
	R1	10	9	364	6.8	〃
	R2	12	20	220	6.9	Rather abnormal smell Softening of meat
	R3	13.5	29	201	7.0	Putrefactive odour
	R4	14.5	55	178	7.2	Strong putrefactive odour
	R5	17	18	196	7.1	〃
	R6	25	90	160	7.2	〃
Boiled meat, which stored with crust after removing carapace.	B0	0	3	147	6.8	Normal
	B1	2	6	189	6.8	〃
	B2	9	9	168	6.9	〃
	B3	18	20	——	7.0	Rathern abnormal odour Softening of meat
	B4	24	34	——	7.1	Putrefactive odour
	B5	26	40	125	7.0	Strong putrefactive odour
	B6	28	50	112	7.2	〃
	B7	41	120	——	7.5	〃
	B8	50	130	——	7.5	〃

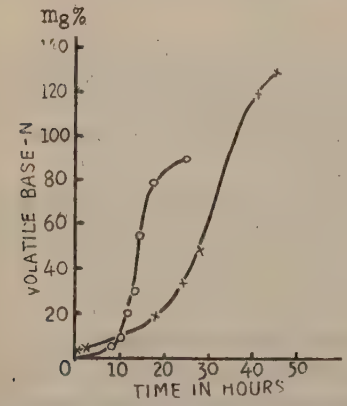


Fig. 1 Changes of the amount of volatile base nitrogen of raw sample and boiled sample at 35°±1°C.
○——○ Raw sample, which with crust and without removal of carapace.
×——× Boiled sample, after removing of carapace.

and crab meat for treatment must be taken out of the cold storage room. As seen in Table 1 in the case of storing of raw material, when the amount of volatile base nitrogen attained to 20 mg%, the crab meat became soft and generated a somewhat abnormal smell. This was observed in the sample R-2. When such deteriorated meat was boiled and cooled, the appearance of the meat became normal. But when such deteriorated meat was packed in can, the quality of the canned product was worse than the normal quality of the canned crab, as indicated in Table 2.

As to the boiled meat with crust after

Table 2. Estimations of samples of canned crab packed as raw or boiled meat having different degrees of freshness.

Samples	Mark of Can.	Out look	Vacuum (inch)	Liquid pH	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	Colour, taste, odour, etc.	Blue meat	Blackening (No. of spot)	Result
Raw crab meat, which stored with carapace.	R0	Normal	13.0	6.8	13	32	Normal, good	+	Can body 3 Cover 1	+++
	R1	〃	15.2	6.8	17	83	〃	++	Can body 2	+++
	R2	〃	16.1	6.8	25	62	〃	++	Can body 4 Cover 1	++
	R3	〃	16.2	7.1	43	122	Liquid turbid, putrefactive odor, softening of meat.	+++	Can body 3	Bad
	R4	Swell		7.1	223	384	Putrefactive odor.	++ ++	Can body 1 Numbers of small blackening spot.	Bad
Boiled crab meat, which stored with carapace.	B0	Normal	12.5	6.8	11	67	Normal, good.	+	Can body 1 Cover and bottom 4	+++
	B1	〃	17.5	6.9		49	〃	++	Can body 9 Small blackening spot	+++
	B2	〃	16.0	6.9	14	70	〃	+	Can body 1 Lap 2 Cover 3	+++
	B3	〃	17.0	6.8	23	57	Lack of liquid, black spot over paper.	++	Can body 6 Other parts 6	++
	B4	Swell	——	7.1	55	224	Liquid turbid, putrefactive odour, deformation of meat.	++	Can body 3 Seaming part 1 Cover and bottom 1	Bad
	B5	Normal	0	6.9	140	274	H_2S odour, liquid turbid.	++	Can body 3 Other parts 9	Bad
	B6	Swell	——	7.1	276	437	Liquid turbid, putrefactive odour, deformation of meat.	++	Can body 5 Cover and bottom 8	Bad

removal of carapace which was stored at 35° ± 1°C, when the amount of volatile base nitrogen reached 19.6 mg%, the meat was found to have become soft and viscous by finger touching, and it generated a tainted smell.

When such deteriorated meat was packed in can, this canned meat was edible, but its quality is worse than the normal quality of the canned crab, as indicated in Table 2.

In conclusion, when the amount of volatile base nitrogen produced in raw meat or boiled crab meat attains to about 20 mg%, the meat becomes unfit material for canning. When such decomposed meat was packed, the quality of the canned crab meat became so bad that swelled can, or softening of canned meat, and blue meat were observed to occur.

Here, the authors call the time until which the amount of volatile base nitrogen rcached to 20 mg% in the crab meat the "maximum time of storing the crab meat". The authors have discussed the relationship between this maximum time of storing the crab meat and the storing temperatures.

Citing from Table 2 of article II of Report I, which summarized a discussion of the bacterial decomposition velocity of *Erimacrus isenbeckii*, the values of time, t_{20}, at which the amount of volatile base nitrogen produced in the crab meat reached to 20 mg%, are collated in Table 3 for various treatments of the crab meat as follows.

Table 3.Comparison of the values of "t_{20}" of the different samples.

No.	Sample \ Temp.	4°C	23°C	24°C	35°C	Remarks.
I	Raw crab	30 hrs.	——	12	5.5	(4-35°C) $Q_{10}=1.2$
II	Boiled crab	70	——	20	9	(4-23°C) $Q_{10}=1.4$
III	Raw crab, with crust without removal of carapace.	(70)	Average 16 | 27 | 21.5	——	11.5	$Q_{10}=1.8$
IV	Boiled meat, with crust, which were removed from carapace.	(140)	——	(35)	17.5	$Q_{10}=2$

(I) Samples of raw leg and shoulder meat removed from the crust, and stored aerobically at 4°, 24° and 35°C.

(II) Samples of boiled leg and shoulder meat removed from the crust, stored aerobically at 4°, 24° and 35°C.

(III) Samples of raw leg and shoulder meat with crust without removal of the carapace, stored aerobically at 35°C.

(IV) Samples of boiled leg and shoulder meat with crust which were removed from the carapace, stored aerobically at 35°C.

In Table 3, the value of "t_{20}" found for sample (III) at 23°C is the average value of 16 and 27 which were the values of shoulder meat and leg meat respectively, the values given in parentheses were calculated from the following equation (7).

$$\log \frac{t\theta_1}{t\theta_2} = \frac{\theta_2-\theta_1}{10} \log Q_{10} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (7)$$

The value of "t_{20}" of sample (III) at 4°C was calculated from Q_{10} as 1.8, and for sample (IV) at 4°C or 24°C, Q_{10} was 2. The values of Q_{10} for samples (I), (II) and (III) are shown in the remarks column in Table 3. Those values were calculated from the values of volatile

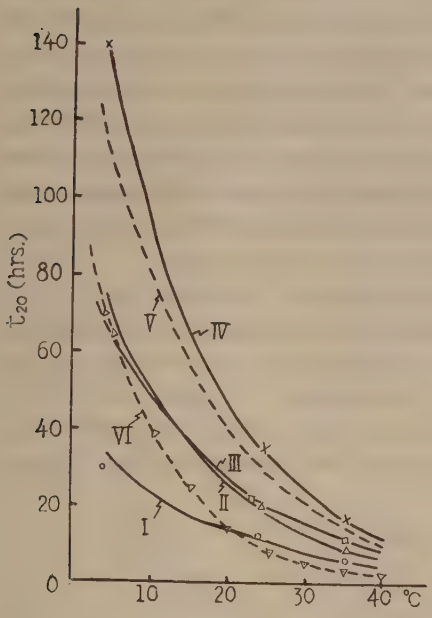


Fig. 2 Relation between the value of "t_{20}" and storing temperature.

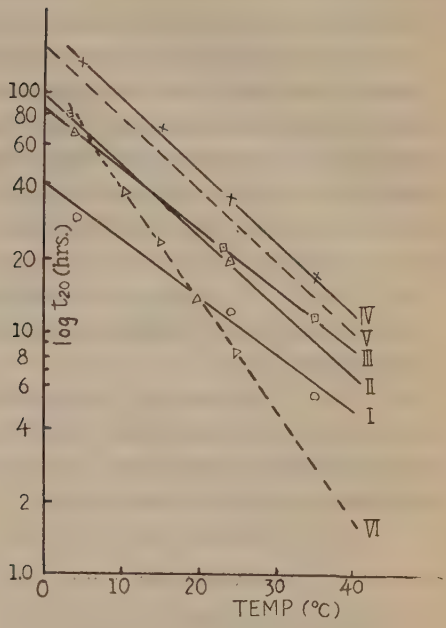


Fig. 3 Relation between the value of "log t_{20}" and temperature.

base producing velocity and have been already reported in a previous Report in detail.

From Table 3, the relation between the values of "t_{20}" and various storing temperatures is shown as curves I, II, III and IV in Fig. 2. The relation between the values of "log t_{20}" and various storing temperatures is linear; the maximum time of leaving the crab meat "t," is given by the following equation (8).

$$\log t_\theta = A - B\theta \quad \cdots\cdots (8)$$

In equation (8) A and B are constant for each sample. Curve IV in Figs. 2 and 3 shows the relation between the value of "t_{20}" and the storing temperatures after boiling of leg and shoulder meat which were removed from carapace.

In the processing of canned crab, the operations of removal of crust of leg, washing, selecting of meat, and packing give the occasion to contamination of bacteria because of contact with the air; there are also differences of speed until the completion of processing for various reasons. When the raw material is carried into the factory, material of various degrees of freshness are mixed indiscriminately, e.g. living crabs and crabs which were already dead when removed from the nets, whose death time is not exactly known.

When the sum of such differences of time as a safety time is added to the commercial operation time (strictly speaking the time of difference between the minimum and maximum time to complete processing of canned crab after the death of crab), the supposing

that this time is 10 hours at 15° storage temperture as KANEKO[1] says, then the curve of supposition in shown as IV straight line which runs parallel with V-straight line in Fig. 3. This V-straight line in Fig. 3 is rewritten as V curve in Fig. 2. VI-curve in Fig. 2 or VI-straight line in Fig. 3 was offered by KANEKO, which showed the relation between various storage temperatures and the maximum limit time of storing of boiled crab meat (*Paralithodes camtschatica*) with crust after removal of carapace, as indicated by organoleptic test. KANEKO has drawn out VI-curve as follows: In the case the raw material was meat of *Paralithodes camtschatica*, the relation between the maximum limit time of storing, $t_{\theta r}$ and room temperature, θr, is shown as equation (9).

$$\log t_{\theta r} = 2.20 - 0.045\ \theta r \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (9)$$

Here, if safety time as above stated is 10 hours at 15°C, the equation (9) is substituted by the equation (10).

$$\log t_{\theta r} = 2.04 - 0.045\ \theta r \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (10)$$

The equation (10) is shown as VI-line. in Figs. 2 and 3. In the case of the raw material was *Erimacrus isenbeckii* which has been used by the authors, each straight line in Fig. 3 is expressed by the following equation.

I-straight line ····· $\log t_{\theta r} = 1.62 - 0.024\theta r$

II-straight line ····· $\log t_{\theta r} = 1.99 - 0.029\theta r$

III-straight line ····· $\log t_{\theta r} = 1.75 - 0.018\theta r$

IV-straight line ····· $\log t_{\theta r} = 2.27 - 0.03\ \theta r$

V-straight line ····· $\log t_{\theta r} = 2.19 - 0.03\ \theta r$

From equation (7) the values of Q_{10} of each straight line in Fig. 3 are calculated as follows.

I-straight line ····· $Q_{10} = 1.7$, II-straight line ····· $Q_{10} = 1.9$

III-straight line ····· $Q_{10} = 1.8$, IV-straight line ····· $Q_{10} = 2.0$

According to KANEKO, the value of Q_{10} of *Paralithodes camtschatica* calculated from the VI-straight line in Fig. 3 is 2.8. Compared the values of Q_{10} of each straight line (that is to say each sample) calculated by equation (7) with values of Q_{10} which are shown in Table 3, calculated by the producing velocity of volatile base, there seemed to be some difference for samples (I) and (II).

The values of Q_{10} which are given in Table 3 seem to be smaller than 2~3 of the value of Q_{10} of general chemical reaction. This is perhaps due to the reason that the bacterial decomposition velocity constant, K, is influenced by some factors, e.g. the temperature and specific humidity in storing place, water content in the samples, contamination by bacteria, the kind and number of bacteria attached to the sample.

Equation (7) used for the calculation of Q_{10} is expressed by a factor of temperature only, that is to say, supposing the bacterial decomposition velocity constant, K, is K_θ at θ°C of storing temperature, $K_{\theta+10}$ at $(\theta+10)$°C, the Q_{10} is $\frac{K_{\theta+10}}{K_\theta}$. The other factors are regarded as the same.

The making of an equation in which the other factors are inserted is reserved for further studies.

Compared the VI-curve or VI-straight line respectively in Fig. 2 or Fig. 3 which were obtained by KANEKO for the meat of *Paralithodes camtschatica* with V-curve or V-straight line which were obtained by the present authors for the meat of *Erimacrus isenbeckii*, there is some difference. The meat of *Paralithodes camtschatica* seems more decomposable than the other from Figs. 2 and 3, although both samples were treated as the same, that is to say, both samples were boiled after removing carapace and stored meat with crust. This difference is perhaps due to the difference of experimental methods such as chemical test or organoleptic test, different kind of sample, and storing condition. So it is impossible to reach a strict conclusion.

Furthermore, the authors wish to study *Paralithodes camtschatica* as sample using exactly the methods as they used with sample of *Erimacrus isenbeckii*, and to discuss in detail the results which will be obtained.

Fig. 4 shows scales for the relation of the maximum time limit of storing crab meat

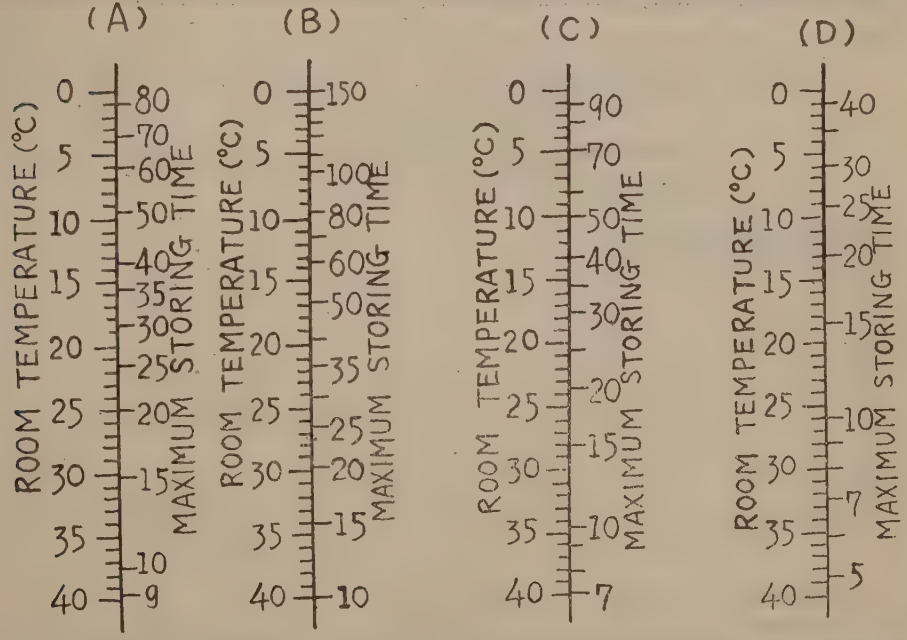


Fig. 4 Relation between storing temperature and maximum storing time for each samples.
(A) is in the case of storing crab body as it is.
(B) is in the case of storing boiled meat with crust after removal of carapace.
(C) is in the case of storing boiled meat without crust.
(D) is in the case of storing raw meat after removal from crust.

(*Erimacrus isenbeckii*) and the storing temperatures. In the scale, (A) is in the case of storing crab body as it is. This scale will be used for fresh raw crab meat. (B) is in the case of storing boiled meat with crust after removal of carapace, (C) is in the case of

storing boiled meat without crust (In this case, a safety time added is 10 hours). This scale can be used in the cases of selecting meat operation and packing operation. (D) is in the case of storing raw meat after removal from crust; this scale is rarely used for normal canning process.

By those scales it becomes possible to know the maximum time limit of keeping crab meat (*Erimacrus isenbeckii*) at various storage termperatures, e.g. when storing temperature is 22°C, (A) is 24 hours, (B) is 34 hours, (C) is 23 hours and (D) is 13 hours.

If those maximum time limits for storing crab meat are known, the limit time is also known for storing cans packed (not yet sterilized) in front of the retort after the beginning of the operations of removing carapace, boiling, taking off meat, selecting of meat, and packing. Within those time limits, processing must be completed. In order to compare the calculted values from the author's scale with practical values in the canning process, various samples (Samples (II), (III), (IV) as stated above) were stored at 22°C, and the relation between storing time and the quality of canned crab made from samples was studied.

Table 4. The relation between different storing time at 22°C and the quality of canned crab meat.

	Time (hrs.)	Vacuum (inch)	pH	Volatile base-N (mg%)	Amino acid-N (mg%)	Blue meat.	Colour, taste. and odour of meat.	Result.
Raw crab meat, with crust without removal of carapace.	22	16	6.6	8	70	++	Normal	+++
	24	13	6.8	13	32	++	Normal. Loss the colour.	+++
	26	16.2	7.1	43	120	+++	Liguid turbid, abnormal smell.	+
After removal of carapace and boiling (with crust).	32	12.5	6.8	10	49	+	Normal	+++
	34	17.5	6.9	14	70	+	Normal. Loss the taste.	++
	36	Swell	7.1	140	274	++	Odour of H_2S gas. Turbid.	−
Crab meat, which taken off crust, after removeal of carapace and boiling.	20	12	6.8	17	83	++	Normal	+++
	23	15.2	6.9	23	58	++	Abnormal smell.	++
	26	15.2	7.1	43	150	+++	Liguid turbid. Tainted smell.	—

The experimental results were as shown in Table 4.

As seen in Table 4, the calculated value of maximum limit time of storing almost agree with the practical values.

4. Summary

The freshness of the meat of crab (*Erimacrus isenbeckii*) was artificially varied by leaving raw crab body as it was, or by leaving boiled meat with crust after removal of carapace.

The degree of freshness of those sample was determined by chemical test such as the estimation of the amount of volatile base nitrogen, amino acid nitrogen, value of pH, and

organoleptic test.

Crab meat of various degrees of freshness was packed in cans and processed. After a certain period the cans were opened, and the quality of canned meat was determined by chemical and organoleptic tests. According to the previous experiments, it is known that raw or boiled meat, of which the amount of volatile base nitrogen is estimated as 20 mg% is no more fit material for canned crab.

The relation between the maximum limit time of storing of crab meat (*Erimacrus isenbeckii*) and the storing temperatures was discussed.

It was admitted that there was relation between storing temperature, θr, and storing time $t_{\theta r}$; the relation can be expressed by the equation $\log t_{\theta r} = A - B_{\theta r}$. This equation was applied for every sample which was treated by different operations. From the results obtained by using the equation, when the storing temperature is 22°C, the maximum limit time of storing the crab meat is found to be 24 hours in the case of boiled meat with crust after removal of carapace, 23 hours in the case of boiled meat without crust and 13 hours in the case of raw meat without crust. Those calculated values from the authors' scale are known to agree almost exactly with the practical values from experiment.

The value of Q_{10} for the crab meat was obtained as 1.7～2.0.

Literature cited

(1) KANEKO (1952) : The Canners Journal (Kanzume jiho) Vol. 31, No. 7, p. 78

(水産科学研究所業績 第157号)

BEHAVIOR OF COLLOIDS IN EXTREMELY DILUTED SOLUTION OF POLYELECTROLYTE AS OBSERVED BY THE CHANGE IN SPECTRUM OF METACHROMATIC DYE *

Kenji KATO

Faculty of Fisheries (Hakodate), Hokkaido University.

Certain dyes change color in the presence of various colloids. Familiar examples are the variation in color of a biological stain depending on the nature of the stainable substrate, which was called "metachromasy" by P. Erlich.

There are two generally accepted interpretations of the mechanism of metachromasy. E. G. Kelley[1] and L. Michaelis[2][3] have pointed out that all those dyestuffs which exhibit polymerization in aqueous solution show the effect of metachromasy. However, H. TERAYAMA[4] and R. C. Merril et al[5] have emphasized that the variation of color is induced by the electrostatical interaction between the colloidal polyions and the dye ions. Neither interpretation will be perfect for all experiments, but they are satisfactory for most practical experiments.

Hitherto many studies on the phenomenon have been carried out chiefly for the purpose of clarifying the causes of color change from the standpoint of molecular interpretation of the dyestuff. On the other hand, critical concentration of micell formation in colloidal solution, as in soap[6] or detergent,[7][8] has been determined by the change in color and the spectrum of metachromatic dye, such as pinacyanol. However, few studies on metachromatic dye as an indicator for a certain colloidal state of polymolecular solution have been carried out.

In this investigation, some spectrochemical observations were made on the change in absorption spectrum of metachromatic dye, such as toluidine blue or thionine, in the presence of algin, being a typical natural polyelectrolyte. The purpose was to clarify the colloidal states of algin in extremely diluted solution, where it could be hardly expected that ordinary methods, involving measurements of the viscosity or the osmotic pressure, would be entirely useful in respect to satisfactory accuracy.

Some physico chemical properties, viz., viscosity, electroconductivity, pH and so on, of the diluted algin solution had been determined, and were compared with the results of the spectrochemical investigation.

It will become clear that the metachromasy method is excellent for investigation of colloid chemical states in colloid solution, especially in extremely diluted condition.

Experimental

Commercial pruduct, MITSUISHI KOMBU, *Laminaria angustata* Kjellm., from HIDAKA, HOKKAIDO, was used as raw material.

---

* This paper was presented at the annual meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, Tokyo, April, 1952.

Na-alginate, so-called ALGIN, for the experiments was prepared by SUZUKI's method.[9] First, raw material was boiled in water, digested in $CaCl_2$ solution and further in NaCl solution, and the treated material was made soluble by adding Na_2CO_3. Filtering the gruel of algin, the filtrate containing crude Na alginate was acidified with HCl, so that alginic acid was coagulated out. The coagulated alginic acid was washed with hot water (50 55°C), and converted to Na alginate through neutralizing with NaOH solution.

The obtained Na alginate was further purified repeatedly by the ordinary method. The purified algin was washed with ethanol, then with ether, and dried at 100° C for 2 hours.

The algin prepared by the above discribed method was snow white and flocky, with humidity of 10.52%.

The aqueous algin solution was very viscous; average molecular weight calculated from intrinsic viscosity of the solution was about 29300 (degree of polymerization was 148). Certain physico chemical properties of the aqueous algin solution are summarized in Fig. 1. (cf. the other reports[10] for details.)

On preparing the algin solution, the mixture of algin and distilled water was allowed to stand for 24 hours or over, making the dispersion of the colloid complete.

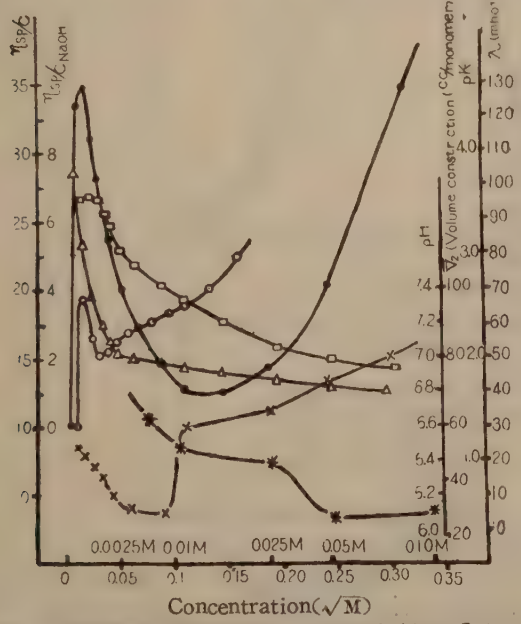


Fig. 1 Physical Properties of Diluted Algin Solution.[10]
●-●-● Reduced Viscosity, η_{sp}/C (C:g/dl)
○-○-○ Reduced Viscosity in 2N NaOH solution, η_{sp}/C_{NaOH}
△-△-△ Molar Electroconductivity, λ ($^{mho}/_{monomer}$)
□-□-□ Dissociation Constant, pk
×-×-× pH
※-※-※ Volume Constraction $\overline{V}_2$ ($^{c.c.}/_{monomer}$)

The metachromatic dyes, viz. thionine or toluidine blue, were commercial products, being used without further purification. The thionine was purchased from Wakoh Junyaku Co., and the toluidine blue was Grübler's Toluidine Blue 0. Each dye was dissolved in redistilled water to make 2.8mg M/l solution, pH 5-6. One ml of the dye solution was added into 10 ml of algin solution, and the variation in color of the mixed solution was measured spectometrically. However, the spectrum of the dye in 0.025 M/l or higher algin solution could not be measured owing to coagulation of the dye. The range of concentration of added algin solution was, consequently, $4.6\times10^{-5}-2.3\times10^{-2}$ M/l in the spectrochemical investigation.

The absorption spectrum was

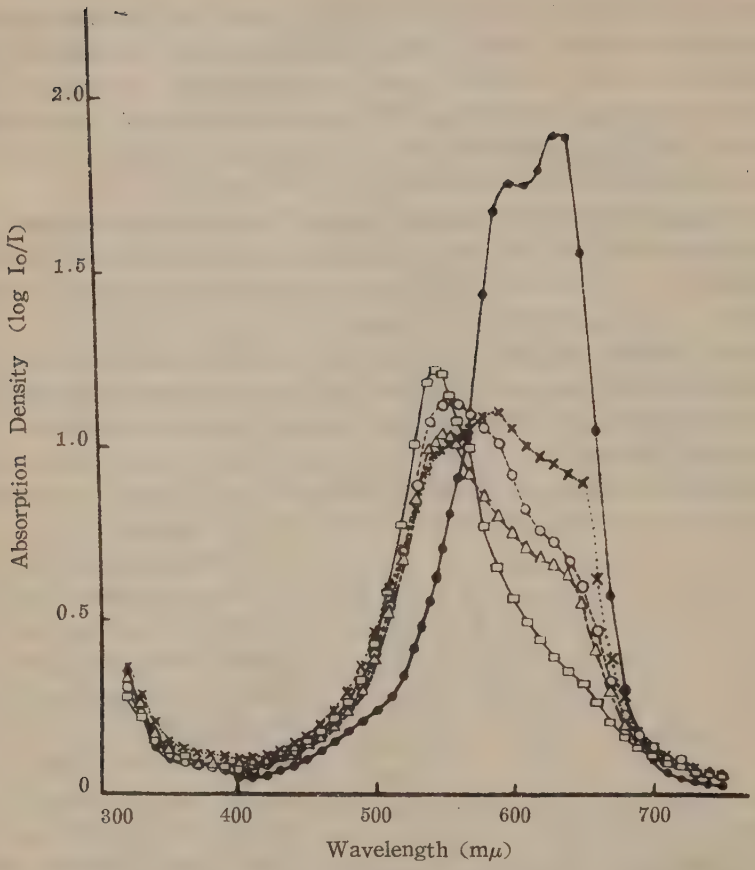


Fig. 2 Absorption Spectra of Toluidine Blue in Water and in Algin Solutions.

●—●—● in H_2O
△--△--△ in 4.6×10^{-5} M/l Na-alginate
□—□—□ in 4.63×10^{-4} M/l Na-alginate
○--○--○ in 4.63×10^{-3} M/l Na-alginate
×···×···× in 2.31×10^{-2} M/l Na-alginate

Table 1. The Intensities of Band Maxima in 2.8mg/l Solution of Toluidine Blue.

Solvent	α-Band		β-Band		μ-Band	
	mμ	log I_O/I	mμ	log I_O/I	mμ	log I_O/I
H_2O	632	1.810	601	1.753	——	——
4.6×10^{-5}M/l Na-alginate	640	0.625	590	0.954	550	1.122
4.63×10^{-4}M/l Na-alginate	(640)	(0.361)	(590)	(0.651)	544	1.223
4.63×10^{-3}M/l Na-alginate	640	0.620	590	0.802	550	1.020
2.31×10^{-2}M/l Na-alginate	640	0.925	590	1.085	554	0.993

Table 2. The Intensities of Band Maxima in 2.8 mg/dl Solution of Thionine

Solvent	α-Band		β-Band		μ-Band	
	mμ	log I_0/I	mμ	log I_0/I	mμ	log I_0/I
H_2O	595	2.752	560	2.400	——	——
4.6×10^{-5}M/l Na-alginate	600	2.391	564	1.773	505	0.751
4.63×10^{-4}M/l Na-alginate	584	1.012	525	1.604	515	1.583
4.63×10^{-3}M/l Na-alginate	640	0.925	590	1.085	544	0.993

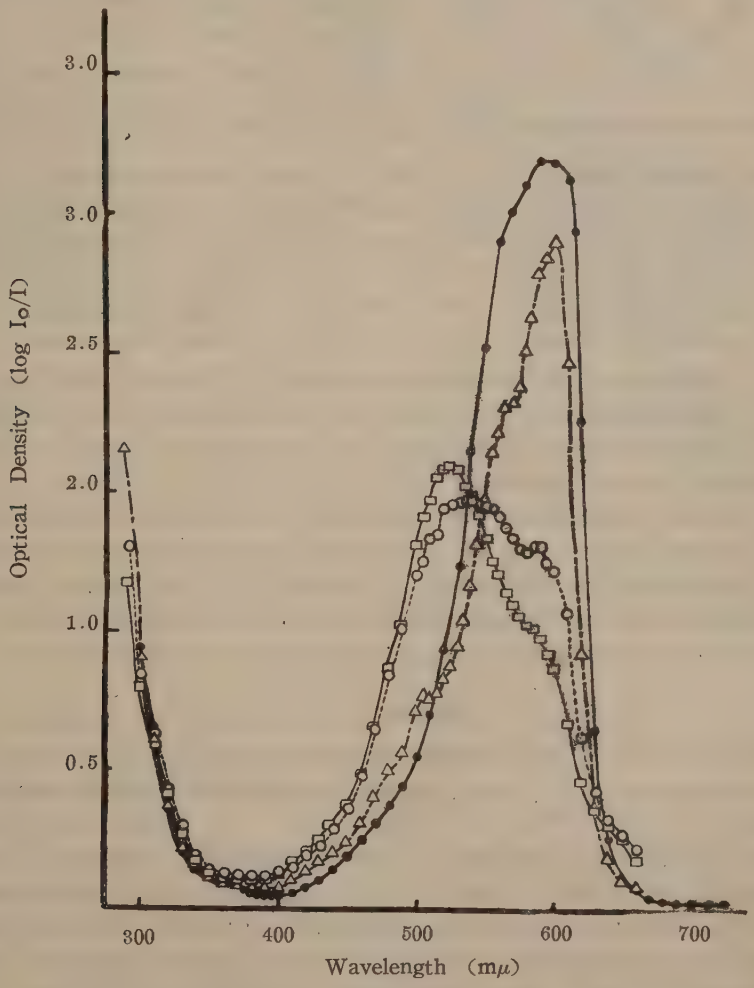


Fig. 3 Absorption Spectra of Thionine in Water and in Algin Solutions.

●—●—● in H_2O □—□—□ in 4.63×10^{-4}M/l Na-alginate
△--△--△ in 4.6×10^{-5}M/l Na-alginate ○--○--○ in 4.63×10^{-3}M/l Na-alginate

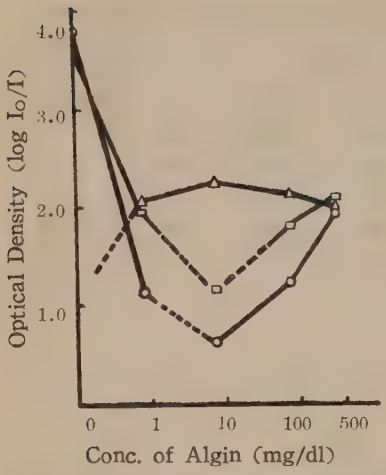


Fig. 4 The Variations in Intensities of Absorption Maxima of Toluidine Blue in Water and in Algin Solution.
○-○-○ α-Band (632～646mμ)
□-□-□ β-Band (601～590mμ)
△-△-△ μ-Band (544～560mμ)

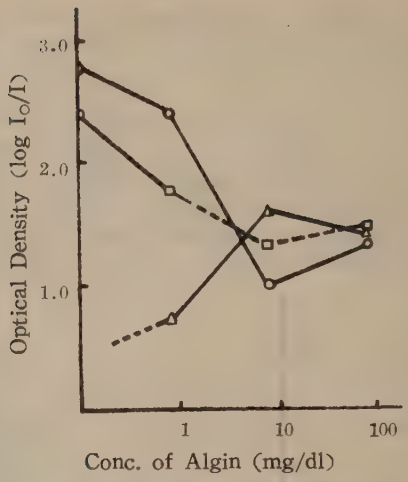


Fig. 5 The Variations in Intensities of Absorption Maxima of Thionine in Water and in Algin Solution.
○-○-○ α-Band (584～600mμ)
□-□-□ β-Band (546～564mμ)
△-△-△ μ-Band (522～530mμ)

observed with a Beckman's quartz spectrophotometer Model DU. Optical density, log I_o/I, where I_o and I are the intensities of the incident and transmitted light, was obtained at 10 mμ intervals of the range from 300 mμ to 900 mμ at wavelength. All the absorption curves were obtained at room temperature (25-27°C).

Previous to observing the spectrum of the dye solution, the absorption spectrum of 0.05M algin solution had been observed, and then it was hardly possible to detect any absorption, but only a slight absorption was observed in the ultraviolet, i.e. 0.02 in optical density at 300 mμ. Consequently, it may be stated that measurement on absorption spectrum of the dye in algin solution is not influenced by the absorption spectrum of the added algin.

Results

The absorption spectra of 2.8 mg/dl toluidine blue in water and in diluted solutions of Na-alginate, are shown in Fig. 2. Table 1 gives the intensities of the band maxima for these solutions.

The toluidine blue in water has two band maxima in the visible, occurring at 632 mμ (α-band) and at 601 mμ (β-band). Addition of algin to the dye reduces the intensities of these bands, while, a new band depending on metachromatic properties develops, and then the color of the dye changes into purple in algin solution in spite of its appearing blue in water.

On absorption spectrum of the dye in 4.6×10^{-5}M/l algin solution, the intensity of α-band at 640 mμ declines to about one-third and β-band is almost annihilated, but a new

one, the μ-band, appears at 550 mμ.

The absorption spectrum of toluidine blue in 4.63×10^{-4}M/l algin solution is very characteriestic. That is, the peak of μ-band at 544 mμ develops progressively, while, both α- and β band have quite disappeared. With further increasing the concentration of added algin, the intensity of μ-band begins to decrease.

It is remarkable that, in 4.63×10^{-3}M/l algin, the height of μ-band decreases and, on the contrary, that of the α- and β-bands apparently increases.

The absorption spectrum of the dye in higher concentration of algin, 2.31×10^{-2}M/l, where the gel structure develops gradually, shows three peaks of band maxima, viz., α (at 646 mμ), β-(at 590mμ) and μ-band (at 554mμ).

Fig. 3 shows the absorption spectra of thionine in water and in diluted algin solution. The variations in intensities are summarized in Table 2.

The aqueous thionine solution shows two band maxima, α-band at 595 mμ and β-band at 560 mμ. Addition of algin weakens the intensities of the above bands, but a new band at 530-550 mμ develops in certain concentration of algin as well as in the case of toluidine blue. On the absorption of thionine in 4.6×10^{-5}M/l algin solution, intensities of α-band at 600 mμ and of β-band at 564 mμ decrease slightly, while a new band appears at 530 mμ. The absorption band at 530 mμ has been called μ band or γ-band, which is characteristic of metachromatic effect.

In the presence of 4.63×10^{-4}M/l algin, the absorption spectrum changes remarkably. That is, the intensity of μ-band increases distinctly at 525 mμ, although both α- and β-band fade and almost vanish. However, when the concentration of added algin is 4.63×10^{-3}M/l the intensity of α-band at 590 mμ becomes higher again, and especially β-band at 546 mμ shows its highest peak of absorption, although the height of μ band at 530 mμ decreases.

With further increase of the concentration of algin, the dye coagulates, and consequently the spectrochemical observation of absorption spectrum becomes almost impossible.

Discussion

From the above mentioned results, it is plain enough that the presence of about 5×10^{-4} M/l algin in these dye solutions exerts most remarkable influences upon metachromatic change in color of these dyes.

The absorption spectrum of the metachromatically adsorbed dye shows very characteristic properties: The α-band and β-band are almost or even entirely annihilated, and a new band called μ-band appears; in toluidine blue where the α-and β-band are respectively at 632 646 mμ and 590-601 mμ, the new band has its peak at 544 550 mμ, varying slightly according to conditions.

L. Michaelis[3] has given an interesting explanation of the variation of these three bands: The α-band is characteristic of the monomeric dye-cation and corresponds to an electronic oscillator along the x-axis of the dye molecule (the long axis). The β band is character-

istic of the dimer, and has been interpreted as due to an oscillator in the y direction (the shorter axis in the plane of the molecule). The μ-band is due to the effect of high reversible polymerization of the dye. However, in the case of metachromasy in the presence of diluted algin solution, it is unlikely that the dye should have been adsorbed in the form of polymolecular dye micells, rather that there might be a monomolecular distribution of the dye over the negatively charged sites of the algin polyion. The absorption spectra of the metachromatic dyes are very sensitive to external fields.

According to the electronic interpretation, metachromasy is due to a deviation in the absorption band to shorter wavelength.

The deviation of the absorption band is due to an increase of energy difference between the stable and the excited state, or, in other words, to restriction of quantum resonance in the dye molecule, and the restriction may depend upon electrostatical interaction between the dye ion and the colloidal ion.

In the experiments, the absorption maximum of μ-band deviated slightly with increase in concentration of added algin, and the wavelength was the shortest in about 5×10^{-4}M/l algin, where resonance of in the dye molecule was restricted firmly, on the other hand, in the above mentioned concentration of algin, the wavelengths of these absorption maxima were rather longer, where the restriction was merely loose.

The above considerations may suggest that the deviation with concentration of added algin influences not only the appearance of the characteristic three bands, viz., α-, β- and μ-band corresponding to reversible aggregation of the dye, but also to slight deviation in absorption maximum of the μ-band, in turn, corresponding to the degree of resonance restriction by algin ion.

In other words, metachromatic effect occurs in sol solution of algin where algin ions would be able to move apart, and the actual number of dissociated radicals in algin will have influence upon both the polymolecular aggregation and the resonance of the dye molecule.

But ionic dissociation of algin is complicated, being due to the colloidal state in aqueous soluton. In an extremely diluted solution of algin, the positive charged Na ions can diffuse away from the negative polyion, but the individual negative charges move apart only until the chain of the polyion has reached its maximum extension under the influence of their mutual repulsion. As the concentration increases and Na-ions are drawn into the sphere of the polyion, internal repulsions will be compensated, and the normal tendency of the chain to curl up will appear, possibly enhanced by interionic attraction of the sort which stabilizes the salt crystal.

Consequenty, the effect of metachromasy will be distinguished in extremely diluted algin solution, where the actual number of negative charges on polyion will be most abundant.

The relation between the change in color of the metachromatic dye and the colloidal behavior of added algin will be explained by the colloid-chemical interpretation concerning

the dye and algin.

It may be suggested that metachromatic change is very useful as an index for indicating the critical concentration in extremely diluted solutions of polyelectrolyte where the chain of polyion is on the maximum extension under electrostatical repulsion.

Summary

The variation in color of a metachromatic dye, such as toluidine blue or thionine, in algin solution was observed with Beckman's spectrophotometer.

Algin is a typical natural polyelectrolyte, being in various states in its aqueous solution from the viewpoint of colloid chemistry.

According to the results of the experiment, observation of absorption spectrum of the dye solution in the presence of polyelectrolyte, as algin, will be very useful for investigations on colloid chemical states in the polyelectrolyte solution, especially in extremely diluted condition. That change in color of the dye will be an index for indicating the critical concentration in the polyelectrolyte solution, where the chain of polyion will be on the maximum extension under electrostatical repulsion.

Acknowledgement

The author wishes to thank Prof. N. SUZUKI, Hokkaido University, and Prof. H. TOMINAGA, Tohoku University, for their constant encouragement during the course of this work. He is indebted also to Mr. K. TANII and Mr. E. EBIKO, Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory, for the use of a Beckman's spectrophotometer.

Literature

(1) Kelley, E. G. and Miller, E. G., Jr. : J. Biol. Chem., **110**, (1935), 113, 119.
(2) Michaelis, L. and Granick, H. : J. Amer. Chem. Soc., **67**, (1945), 1212.
(3) Michaelis, L. : J. Phys. & Colloid. Chem., **54**, (1950), 1.
(4) TERAYAMA, H. : KAGAKU no RYOIKI (Jour. Japanese Chem.), **1**, (1947), 17.
(5) Merril, R. C., Sponser, R. W. & Gerry, R. : J. Amer. Chem. Soc., **70**, (1948), 2460.
(6) TACHIBANA, T. : J. Chem. Soc. Japan, (in Japanese), **72**, (1951), 113.
(7) Herzfeld, S. M. : J. Phys. Chem., **56**, (1952), 953.
(8) Eugene, L. and Colchman, I. : J. Amer. Chem. Soc., **73** (1951),
(9) SUZUKI, N. : This bulletin, **4**, (1953), 69.
(10) KATO, K. : Ibid., **4**, (1953) 76, 82; additional results will be printed in near future.

(水産科学研究所業績 第158号)

THERMAL DECOMPOSITION OF ALGINS AS DETERMINED BY THERMO-BALANCE METHOD*

Kenji KATO

Faculty of Fisheries (Hakodate), Hokkaido University.

In general, previous to making a chemical investigation the humidity in the sample must be determined. As water in solid algin combines firmly with algin molecule, it is hardly possible to exactly determine the water content by ordinary method drying at 100°C, and moreover, at higher temperature, thermal decomposition may take place.

Studies on dehydration process of algin are very important not only for chemical investigation on algin, but for industrial manufacture of that substance. However few studies on the dehydration of algin have been made. T. SEIYAMA[1] pointed out that dehydration of algin was so difficult that constant weight might be obtained by drying for 30 hours at 100°C; moreover, Na-alginate was fairly stable for heat in comparison with other polymolecular subtances, and its thermal decomposition proceeded gradually at temperatures from 100 to 170°C, but, over 170°C, the algin has suddenly decomposed.

The present author has observed the process of thermal decomposition of various algins with the thermo balance and ascertained the decomposition temperatures from the weight reduction curves.

Experimental

As raw material for algins in this experiment, MITSUISHI KOMBU, *Laminaria angustata* Kjellm., was used.

First, alginic acid was made by SUZUKI's method[2]: The plant was preliminarily treated with boiling water, $CaCl_2$ solution and with NaCl solution. The treated material was dissolved by adding Na_2CO_3, and the insoluble residue was filtered out. The filtrate was acidified with HCl, where alginic acid was coagulated out. The crude alginic acid was purified repeatedly by the ordinary method. Na-alginate was prepared by adding NaOH to the alginic acid, and insoluble algins (M-Alginate) were derived by double decomposition with their corresponding salts (M-chloride).

The thus prepared algins, such as alginic acid, Na-alginate, Ca alginate, Fe-alginate, and Al-alginate, were washed with ethanol and next with ether, and dried at 95°C for 2 hours.

But, of Na-alginate, two samples were prepared with different coagulating agents, viz., ethanol and methanol.

---

* This paper was presented at the annual meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, Tokyo, April, 1952.

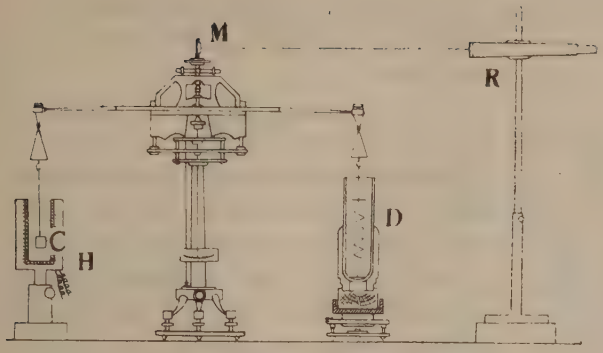


Fig. 1 HONDA's Thermo-balance

Table 1. Thermal decomposition temperatures of algins

Algin	Decomposition temperature (°C)
Alginic acid	186
Na-alginate(1)	221.5
Na-alginate(2)	231.5
Ca-alginate	204.5
Al-alginate	196
Fe-alginate	218.5

(1) Na-alginate coagulated with ethanol.
(2) Na alginate coagulated with methanol.

The thermal decomposition was observed with HONDA's thermo-balance[3] (Fig. 1) at the physico-chemical laboratory of the Science Faculty, Tohoku University.

In the experiment, 0.5 g of the sample was put in Pt-crucible (C), and heated gradually with electric heater (H), and the reduction in weight by drying was observed with reflector (R). The temperature in the electric heater was measured with thermo-couple set in the heater. The oil damper (D) was effective for preventing fluctuation in balancing.

As the velocity of reaction in a solid is very slow, the heating ought to be done as slowly as possible. It took 4 5 hours for elevation from room temperature to 250°C.

Results

Fig. 2 shows the decomposition curves on various algins; their decomposition temperatures are summarized in Table 1.

According to the results the algins seem to be fairly stable against heat.

The weight of algin decreased remarkably till 100°C, where the greater part of free water would be removed, but over 100°C, the curve became almost flat, where a little decomposition of algin or gradual liberation of bound water would take place. However the algin began to decompose suddenly at a certain temperature in the range of 186°-231.5°C, and gave off a distinct burning smell.

It seems that the decomposability of algin depends upon the combined metal ion of the salt, or on the preparatory treatment: Alginic acid appears to be less stable than the salts, and especially Na-alginate is most stable against heat.

The above results seem to indicate that the metal ion in the salt defends the algin molecule from thermal decomposition, and the defending effect is most remarkable in the case of Na-ion, whose hydration energy is greater than the others.

Even treating in lower temperatures than that of decomposition, the colloidal properties of aqueous solution of the treated algin would be different from the untreated. Colloid-chemi-

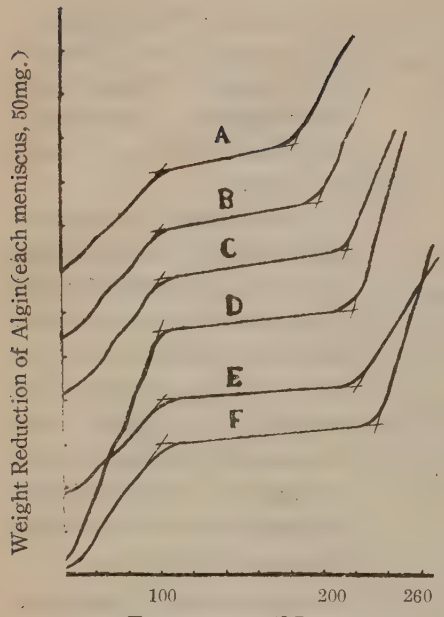


Fig. 2 Thermal Decomposition of Algins.
A : alginic acid
B : Al-alginate
C : Ca-alginate
D : Fe-alginate
E : Na-alginate(coagulated with ethanol)
F : Na-alginate(coagulated with methanol)

cal investigations of the dehydrated algin at different temperatures will be reported in the near future.

Summary

Thermal decomposition of various algins, such as alginic acid and its Na-, Ca-, Fe- and Al-salts, was observed respectively with a thermo-balance. Their decomposition temperatures were ascertained from the obtained thermal decompostion curves.

Every investigated algins was fairly stable against heat, especially Na-alginate.

Acknowledgement

The author wishes to thank Prof. N. SUZUKI for his constant encouragement during this work, and Prof. H. TOMINAGA for the use of thermo-balance.

Literature

1) SEIYAMA, T. ; J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Section, 52 (1950), 298 (in Japanese)
2) SUZUKI, N. : This bulletin, 4, (1953), 69 (in Japanese).
3) ISHIMARU, S. : "The Experimental methods of Chemistry," Part I, Vol. 10, (1942), 97. Tokyo. (in Japanese)

(水産科学研究所業績 第159号)

STUDIES ON SHARK MUSCLE
PART 3. PUTREFACTION AND INDOL CONTENT OF SHARK MEAT

Keiichi OHOISHI

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

Introduction

The curve representing the accumulation of ammonia in the shark meat which is stored at the temperature range of 5° to 20°C is not a sigmoid curve. It turns once at a certain point and then forms a step. Beyond this step, the meat which had seemed fresh in spite of its vigorous ammoniacal odor, showed the putrefactive appearance and developed putrefactive odor such as that of indol. In order to explain this changing of odor chemically and to observe the putrefactive phenomenon of shark meat, studies were made on the formation of ammonia as well as that of indol within samples of shark meat at 37°, 20° and 11° to 13° C.

Experimental

The shark meat samples in this experiment were from "Hoshizame" fish (*Mustelus manazo* BLEEKER) and "Dochizame" fish (*Triakis scyllium* MUELIER *et* HENLE), both most commonly found in Japan. Fine meat of these species of shark (after being separated from skin, connective tissue, blooded muscle etc.) was taken and minced twice. Samples, respectively, were then placed in containers, closed tightly and stored at a certain fixed temperature. At intervals, parts of the samples were taken out to be used to determine the ammonia and indol content. The ammonia as cited in this paper means strictly all the volatile basic nitrogen obtained, by the ordinary aeration mothod. The quantitative analysis of indol is made by TANIKAWA's method described as follows[1]: weigh out 100gm of sample, and place it with 200 c.c. of distilled water in a one liter flask. As an antiforming agent, liquid paraffin is added. Heat the flask in boiling saturated solution of sodium chloride until 500 c.c. of distillate is obtained by vapour distillation. Add 100 c.c. of concentrated hydrochloric acid to make acidic, then add 120 c.c. ether to dissolve its indol content. Wash the ether part with 25 c.c. of 2.5% caustic soda; then wash it again with 25 c.c. of 2% hydrochloric acid. Transfer the ether into a beaker and add to it 10 c.c. of distilled water. Heat the beaker on a water bath to 40°C so as to evaporate its ether. An aquatic solution of indol is thus obtained. This is used for the determination of indol. Take 5 c.c. of this sample solution into a test tube and determine indol content with colorimetric method using EHRLICH's reagent.

The observed value is indicated as the logarithmic index of indol content in mg in 100 gm of shark meat. Since the curve of ammonia accumulation of shark meat at a certain temperature seems to indicate the changing phases in freshness of the meat at that temper-

ature[2], so the quantitative values of indol are indicated on the ammonia curve as shown in Fig. 1.

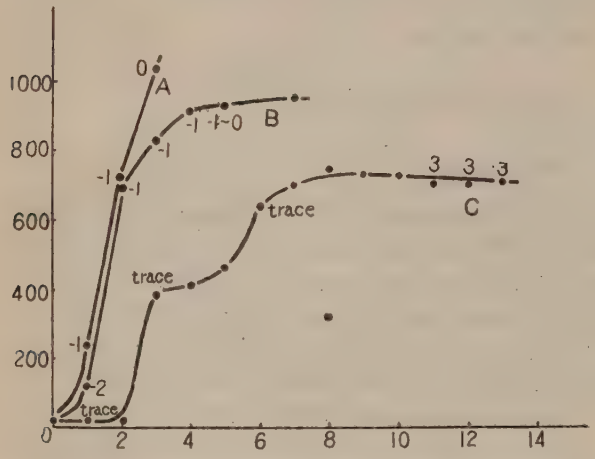


Fig. 1 Indol content of shark meat, stored at various temperatures:
A, dochizame, 37°; B, hoshizame, 20°; C, hoshizame, 11° to 13° C.
A point "·" which is marked in this figure shows a basic nitrogen content, and numeral on the point shows an indol content. (Unit: logarithmic index of indol mg%)
Ordinate: volatile basic nitrogen (mg%).
Abscissa: time (days).

Observation

From Fig. 1, it is clear that ammonia developing speed is greater as the temparature is raised, and the same may be said of indol. At 11° to 13°C., the amount of indol is rather smaller when compared with the ammonia content. According to the results obtained by CLOUGH's investigation[3], when the indol content of a meat sample reaches to 0.0015 mg% , the meat is regarded to be on the point of putrefaction. If this limit is applied to the shark meat, the meat which is kept at a temperature 11° to 13°C though its ammonia content is remarkably large, putrefies only after rather a long time. At or above a temperature of 20°C shark meat putrefies at a speed six times greater than at 11° to 13°C, as far as its indol content is concerned.

Generally speaking, the putrefactive odor of shark meat is noticeable, if its indol amount reaches more than 0.1 mg%, but when in a lesser amount, it can not be detected owing to the remarkable odor of ammonia.

In Fig. 1, "trace" means an indole content less than ca. 0.0009 mg%, the quantitative analysis of which is hard to determine by this experimental operation. With such an amount of indol, no putrefactive features except ammoniacal odor are found.

Juding from the indol content, the results obtained are the same as those observed histochemically[4]. At 11° to 13°C, up to the step of the curve, it is hardly to be regarded as a remarkable putrefaction. Therefore, at room temperature of less than 20°C, the putrefaction of shark meat is not said practically to be occuring though the meat is losing its freshness, as long as its ammonia accumulation curve does not reach that peculiar step.

Summary

So far as indol content is concerned, the shark meat which is preserved at temperatures below 20°C, hardly shows putrefactive features, though it does have plentiful ammonia

content.

Literature cited

(1) E. TANIKAWA (1941). Kanzume no kagaku, p. 199.
(2) W. SHIMIZU, K. OHOISHI (1952). Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 16, 423, 545.
(3) R. W. CLOUGH (1922) ; Publ. Puget Sound Biol. Sta., 3, 195.
(4) K. OHOISHI (1953) ; Bull. of Fac. of Fish. Hokkaide Univ., 3

（水産科学研究所業績 第160号）

ワカサギの生態学的研究

第3報　網走湖産ワカサギに於ける鱗相による年令査定の不確実性と其の原因

浜田啓吉
（忍路臨海実験所）

Ecological Study of the Pond Smelt, *Hypomesus olidus* (PALLAS)
Report 3. Uncertainty of Age Determination by the Scale Structure on the Pond Smelt obtained from Lake Abashiri, and the reason thererefor

By
Keikichi HAMADA
(Oshoro Marine Biological Laboratory, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The pond smelt, *Hypomesus olidus* (PALLAS), ascends to spawn in ponds in the region from Alaska to Kamchatka, and also in river of the west Pacific and Japan (Meek, A. 1916). In Lake Abashiri, however, fishes make an ascent from the sea in autumn which has no direct relation with their breeding. It has been reported previously by some authors that the age of this fish can be determined by the annual ring of the scale (AMEMIYA, I and HIYAMA, Y., 1940; KOBAYASHI, H., 1936), but the school constitution of the Lake Abashiri smelt is so peculiar that it can not be placed in the above category. The significant point is that the length frequencies are very similar for fish with and without an annulus (Fig. 1, Fig. 2 and Table 3). This similarity of body length is caused by the intermixture of anadromous fishes into another school which probably lives in the lake through their life. The annual ring is not formed in the scales of the anadromous fish, although the body length corresponds to that of the fish of another school whose menbers have annual rings. The number of vertebrae of the fish obtained from Lake Abashiri fluctuated yearly, and differences are not found among those of the fishes obtained from the coast of Abashiri, Port Abashiri, the River Abashiri (outlet of Lake Abashiri) and Lake Mokoto.

1. 緒　　言

ワカサギの生態に就いては雨宮、桧山（1940）、藤田（1926）、小林（1936）、佐藤（1950）、白石（1951）其の他の研究がある。これ等の研究に於ては何れも年令は鱗に依り明かにされ年令群を識別することが出来た。ワカサギの鱗に現れる年輪は松崎（1916）に依れば冬夏を境として即ち成長の差によつて生ずるものとされ、小林（1936）に依れば産卵記号と云う可きものゝ出現により年令を知るとされた。筆者は網走湖産ワカサギの鱗相は少数の例外を除いて年令を示し多分産卵により生ずるであろうと述べた（1953）。しかしながら秋季網走湖産ワカサギに見られる鱗相は年輪（或いは産卵記号）を示すもの少く鱗相が年令を示すという信頼性は極めて低い。石田（1949）は体長90mmより129mmのワカサギを鱗相から1年魚から3年魚まで査定し体長40mmの1年魚の2倍或は3倍以上の体長の1年魚のあることはこのことを意味するのであろう。以上のことは海より遡上する本種のあるこ

とを推測させるが筆者は鱗に依る年令の不確実性及びその原因について報告する。

本研究に際し北海道大学水産学部教授斎藤三郎並に助教授新山英二郎両氏の御教示を又教授佐藤信一氏に種々御助言を蒙いた。茲に厚く感謝する。標本採集には北海道水産研究所技官石田昭夫及び西網走漁業会佐藤広司両氏の御配慮に依る所が多い。猶本研究に要した費用の一部は文部省科学研究助成補助金に依る。併せてここに謝意を表する。

2. 材料及び観察方法

材料は第1表及び第2表に示された如く網走湖より1947年10月23日21尾、1948年9月1日217尾、1948年10月20日404尾、1949年1月22日200尾、1949年9月2日292尾、1949年10月26日251尾、1950年9月23日178尾、1952年10月27日103尾を西網走に於て曳網により漁獲した。又1949年10月22日網走港内247尾、1949年10月23日網走川(湖流出河川)198尾、1950年9月21日網走海岸57尾、1950年9月21日藻琴沼で181尾を、網走川では手網により他は曳網により漁獲した。何れも約10%ホルマリン液浸標本とした。

Table 1. Distribution of specimens of the pond smelt according to body length in millimetres, obtained from Lake Abashiri.

Body length mm \ Date	Oct. 23, 1947	Sept. 1, 1948	Oct. 20, 1948	Jan. 22, 1949	Sept. 2, 1949	Oct. 26, 1949	Sept. 23, 1950	Oct. 27, 1952
25 ~ 29		14			8			
30 ~ 34		124			23		1	
35 ~ 39		68	6		44		48	2
40 ~ 44		11	31		48		42	14
45 ~ 49			39	16	44	30	16	26
50 ~ 54			31	68	32	56	16	30
55 ~ 59	3		31	45	17	30	11	19
60 ~ 64	2		32	28	23	14	18	6
65 ~ 69			33	5	15	34	12	3
70 ~ 74			61	13	5	45		3
75 ~ 79			66	18	1	19	3	
80 ~ 84			39	5		11		
85 ~ 89	1		14	1		10		
90 ~ 94	3		6		7	2	1	
95 ~ 99	3		1		14		2	
100 ~ 104	2		2		8		2	
105 ~ 109	2		4		1		1	
110 ~ 114			7		1		3	
115 ~ 119			1		1		1	
120 ~ 124	2						1	
125 ~ 129	2			1				
130 ~ 134								
135 ~ 139	1							
Total number	21	217	404	200	292	251	178	103

測定部位は体長、頭長、吻長、顎長、眼径、尾鰭を除く各鰭条数、側線鱗数、脊椎骨数である。本報告に於てはこれら詳細なる点に就いては述べず後の機会とし度い。脊椎骨数にはUrostyleを含めた。鱗は体側脊鰭下

部より後方の色素帯（silverband）より採鱗観察した。本報告に於て1年魚というのは1年に満たないもので2年魚とは満1年と数ケ月のワカサギを意味する。標本中鱗相の観察がないものは鱗が脱落し観察出来なかつたものである。

3. 体長分布より見た年令

第1表に依れば湖水のワカサギの体長分布は1948年9月1日及び1952年10月27日の標本を除き他の標本の体長分布は2或は3モードを有し、明かに体長を異にする魚群の集合であり、年令の差を示すものと推定される。1952年10月27日の標本は70mmを超す体長を示すものが存在し少数の2年魚の混在する可能性がある。

Table 2. Distribution of specimens of the pond smelt according to body length in millimetres.

Localities	Port Abashiri	River Abashiri	Coast of Abashiri	Lake Mokoto
Date / Body length(mm)	Oct. 22, 1949	Oct. 23, 1949	Sept. 21, 1950	Sept. 21, 1950
45 ～ 49				1
50 ～ 54		1		12
55 ～ 59	11	5	9	33
60 ～ 64	61	16	24	89
65 ～ 69	102	57	13	27
70 ～ 74	37	61	7	10
75 ～ 79	21	41	3	
80 ～ 84	13	10	1	
85 ～ 89	2	6		
90 ～ 94		1		
95 ～ 99				
100 ～ 104				4
105 ～ 109				3
110 ～ 114				1
115 ～ 119				1
Total number	247	198	57	181

第2表に依れば網走港内（河水が流出し半鹹水である）ではワカサギの体長は単一モードであり単一の年令群であろうと思われる。しかし稍体長小なる方へ傾いているのは少数の異年魚（1年多い）を混じている可能性がある。網走川（湖と河口の略中間）の標本では単一モードであり漁獲時期も近接しており河口のものと同一のものであると思われる。網走海岸（網走市字二ツ岩）で漁獲した標本も異る年令群の混在を示してはいない。藻琴沼のワカサギは明瞭に2群に分けられ1年魚と2年魚と推定される。

4. 鱗相より見た年令

湖のワカサギは第3表に依れば1949年1月22日の標本は1年魚と2年魚は同一体長を示している。3年魚1尾のみ群より離れている。1950年9月23日の標本では1年魚と2年魚が同一体長を示し、それより分離した2年魚と3年魚の1群がある。1952年10月27日の標本では1年魚と2年魚は異る体長分布を示している。鱗に現れる年輪が年令を示すものとして信頼性を有するものであるなら網走湖のワカサギは1年魚、2年魚及び3年魚より構成され、年令と体長とは相関がない。又1949年10月26日の標本では体長69mm（♂）及び81mm（♂）の2尾に年輪が見られたのみで他には見られない（Fig. 1, 2, 参照）。1949年10月23日網走川で漁獲された標本は4表に示される様に少数の魚体に年輪を見、1950年9月21日藻琴沼のワカサギでは体長では1年魚であるが鱗には年輪を有し2年魚とされるものが7尾見られ、体長がそれらの群より分離している9尾中8尾の鱗には2輪を他の1尾には3輪を見ることが出来た。

Table 3. Distribution of length frequencies of the pond smelt, with and without annulii on scales, taken from Lake Abashiri.

Date	Jan. 22, 1949			Sept. 23, 1950			Oct. 27, 1952		
Body length (mm)	0 ann.	1 ann.	2 ann.	0 ann.	1 ann.	2 ann.	0 ann.	1 ann.	2 ann.
30 ~ 34				2					
35 ~ 39				23			2		
40 ~ 44				13	5		14		
45 ~ 49	16			10	3		26		
50 ~ 54	61	7		4	7		30		
55 ~ 59	31	14		5	7		16	3	
60 ~ 64	12	16		5	13		4	2	
65 ~ 69	1	4		1	10		1	2	
70 ~ 74	9	4		1				3	
75 ~ 79	18			2					
80 ~ 84	3	2							
85 ~ 89	1								
90 ~ 94				1					
95 ~ 99					1	1			
100 ~ 104					2				
105 ~ 109					1				
110 ~ 114					2	1			
115 ~ 119					1				
120 ~ 124									
125 ~ 129			1						

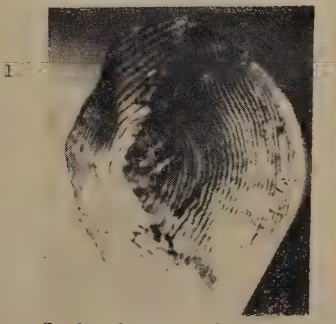


Fig. 1. Scale from a female fish 88mm in body length, taken from Lake Abashiri, October 26, 1949, showing no annulus.

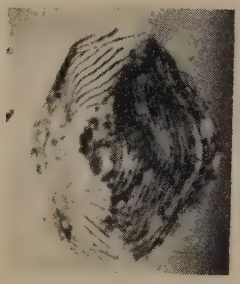


Fig. 2. Scale from a male fish 69mm in body length, taken from Lake Abashiri, October 26, 1949, showing an annulus.

5. 年令決定に於ける体長と鱗相の不一致とその原因に対する考察

ワカサギの年令は雨宮、桧山（1940）、小林（1936）、松崎（1916）、佐藤（1950）等に依つて報告されているが何れも鱗相によつて査定されている。網走湖産ワカサギは前述の如く体長分布より見た年令と鱗相より見た年令とは一致しない。即ち鱗に現れる年輪より見た1年魚と2年魚は同一の体長を示す（Fig. 1, 2）。この原因として考えられる第1の原因は小林の報告した産卵記号であり産卵しない2年魚が多い為に生ずる結果とすることであり、浜田（1953）は1948年4月24日網走湖産ワカサギの年令決定に於て鱗より2年魚と査定された魚体が同様にして査定された1年魚の体長分布に含まれるのは産卵しなかつたワカサギの存在に原因するとした。しかしながら柳本（1916）は霞ケ浦北浦のワカサギ数千尾について調査した結果産卵期に未熟卵を有する魚体が見られず総て満1年で産卵するものとした。又網走湖産ワカサギ（1948年4月24日）についても未熟卵は発見されず、満1年で産卵しないワカサギは極めて稀か或は全くない、それ故上記の産卵しないワカサギの存在は否定される。第二の原因は海より遡上して来たワカサギによることである。佐野（1937）に依れば網走湖で孵化したワカサギは降海をなして降海し河口附近で成長し8月上旬遡上し越冬産卵するという。筆者は第2表に示した如く網走川を遡上中のワカサギを採捕した。この標本198尾中鱗に年輪を示すものは16尾に過ぎず、1950年9月21日網走海岸で採捕したワカサギ57尾は総て年輪を認められない。網走湖1949年10月26日のワカサギは鱗に年輪を示すもの2尾（体長69mm♂、81mm♂）に過ぎず同年同月23日遡上中のワカサギの体長分布は湖のそれの体長の大きい魚群の分布に極めて相似する。石狩川を春季遡上するワカサギの鱗は年輪が見られず、陸封されている石狩古川のワカサギには年輪が見られる（浜田1953）。1949年10月26日に漁獲した網走湖のワカサギ（北海道水産孵化場塩湖実験所沖で漁獲）が年輪を有するものが殆んどないのは同時期に海より遡上するワカサギ群が湖の2年魚に優越する結果である。1949年1月及び1950年9月の標本に於ても体長60～90mmのワカサギで年輪のない魚群は遡上して来たものであり85～120mmの体長を有するもの丶中に年輪に不一致を見るのは遡上して来たワカサギが湖水で産卵し、以後湖水に棲息する為である。

Table 4. Distribution of body length of the pond smelt with and without annulii on the scales.

Localities	River Abashiri			Lake Mokoto		
Date	October 23, 1949			September 21, 1950		
Body length (mm)	0 ann.	1 ann.	2 ann.	0 ann.	1 ann.	2 ann.
45 ～ 49				1		
50 ～ 54		1		12		
55 ～ 59	5			33		
60 ～ 64	14	2		85	4	
65 ～ 69	54	3		26	1	
70 ～ 74	54	7		8	2	
75 ～ 79	33	3				
80 ～ 84	10					
85 ～ 89	6					
90 ～ 94			(3 ann.) 1			
95 ～ 99						
100 ～ 104						4
105 ～ 109						3
110 ～ 114						1
115 ～ 119						(3 ann.) 1

1952年10月27日網走湖産の標本は体長と鱗相より見た年令に他の標本ほどの不一致は見られない。これは漁獲位置(呼人沖)によるものか或は湖上のない為であるか、湖上の有無は網走川に於る曳網漁業が禁止された為に確め得なかつたが例年川岸で盛んに釣獲されるのに反し釣獲のなかつたことから湖上の極めて少いことに依ると思われる　湖上中のワカサギに年輪の見られる魚体が少数ある(第4表)がこれは海に於ける生活中に生じたものか或は湖のワカサギの河へ遡游したものかは不明である。

6.　脊椎骨数より見た網走湖のワカサギと湖上ワカサギ

魚類の脊椎骨数は種族の特徴として使用されることが多い（C. L. Hubbs 1934）。網走湖のワカサギの脊椎骨数の年間変動は第5表及び第7表（June 2, 1949の記録は佐藤1951に依る）に示される，第5表に依れば脊椎骨数は55～56に多く、殆んど54～58に分布している。第7表は第5表に示されたものゝ分散分析の結果を示す。計算に依り$F_0=3.9064$、自由度$n_1=3, n_2=577$のとき危険率$\alpha=0.01$としてF分布表より$F_{0.01}=3.83$であり各標本間の差は有意であり年により変動あることが知られる。

第6表に示された標本間の分散分析の結果は第8表に示されるが、計算上の$F_0=2.151$、自由度$n_1=3$、$n_2=532$のとき危険率$\alpha=0.01$としてF分布表より$F_{0.01}=3.83$であり標本間の差はない。即ち網

Table 5. Distribution of the number of vertebrae of the pond smelt, taken from Lake Abashiri.

Nnmber of vertebrae \ Date	Jan. 22, 1949	*Jan. 2, 1949	Sept. 23, 1950	Oct. 27, 1952
53			1	
54	6	3	11	3
55	42	24	42	33
56	104	65	95	51
57	39	8	28	16
58	8		1	
59	1			
Nnmber of specimens	200	100	178	103
Sum of variate (vertebrae)	11204	5578	9931	5745
Arithmetic mean	56.0200	55.7800	55.7921	55.7766
Sum of squares of variate	627794	311180	554191	320493
Square deviation	145.9200	39.1600	119.3090	55.8640
Standard deviation	0.854	0.625	0.818	0.736

*Data of samples in January 2, 1949 follow R. Sato (1951).

Table 6. Distribution of the number of vertebrae of the pond smelt.

Localities	Port Abashiri	River Abashiri	Coast of Abashiri	Lake Mokoto
Number of vertebrae \ Date	Oct. 22, 1949	Oct. 23, 1949	Sept. 21, 1950	Sept. 21, 1950
52		1		
53		2		
54	6	5		1
55	14	38	10	34
56	57	106	27	101
57	20	41	15	40
58	3	5	5	5
Number of specimens	100	198	57	181
Sum of variate (vertebrae)	5600	11031	3207	10150
Arithmetic mean	56.0000	55.9646	56.2631	56.0773
Sum of squares of variate	313670	620297	180477	569282
Square deviation	70.0000	152.7526	41.0527	96.9172
Standard deviation	0.836	0.878	0.848	0,731

Table 7. Analysis of variance for the number of vertebrae of the pond smelt taken from Lake Abashiri.

	Sum of squares	Degrees of freedom	Umbiased estimate
Between classes	7.3154	3	2.4384
Within classes	360.2030	577	0.6242
Total	367.5184	580	

F_0 calculated $=3.9064$, degrees of freedom $n_1=3$, $n_2=577$ when F in distribution of F equal 3.83 (significance level 0.01%)

Table 8. Analysis of variance for the number of vertebrae of the pond smelt taken from the river Abashiri, Port Abashiri, the coast of Abashiri and Lake Mokoto.

	Sum of squares	Degrees of freedom	Umbiased estimate
Between classes	4.377	3	1.459
Within classes	360.723	532	0.678
Total	365.100	535	

F_0 calculated $=2.151$, degrees of freedom $n_1=3$, $n_2=532$ when F in distriutibon of F equal 3.83 (significance level 0.01%)

走川を遡上するワカサギと海のワカサギとの間には差が見られない。網走川を遡上するワカサギは海のものと同一であり更に藻琴沼のワカサギとの混合の可能性がある。藻琴沼は塩分17g/l Clに達し(元田1950)、1950年9月21日の採集に於てはクロソイ *Sebastes schlegeli* の幼魚4尾及びジンドウイカ *Loligo japonica* 1尾が混獲され海産動物の洄游がありワカサギの降海及び遡上が見られる。網走湖へ遡上するワカサギは佐野(1937)の報告した如く湖水にて孵化したものが降海し再び遡上したものか、或は他から洄游したものかは確な証明もなく、又漁獲の記録も詳でない為(春季降海すると思われる時季は禁漁されている)脊椎骨数を比較した。1949年6月2日の標本(佐藤1950による)と同年10月23日の標本の脊椎骨数をt検定に依り比較した。結果は$t_0=1.79$, 自由度$n=296$, t分布表より危険率$\alpha=0.01$のとき$t_{0.01}>2.576$, 分散比$F_0=1.91$, 自由度$n_1=99, n_2=197$, F分布表より危険率 $\alpha=0.01$として$F_{0.01}=1.48$であり稍分布型を異にする。しかし6月2日の標本には越冬産卵した遡上ワカサギの混在することが考えられ、更に春孵化したワカサギは未だ漁獲の対象となつていないので結論は出来ない。佐藤、加藤、甲地(1950)は小川原沼産ワカサギと高瀬川口附近の海で漁獲されたワカサギの脊椎骨数から両者を同一種族として居り網走湖の場合も少くとも附近の海で漁獲されるワカサギとは完全に独立した群ではないであろう。

7. 結　　論

魚類の鱗が年令査定の方法として一般に用いられてゐるが、又必ずしも年令を示さないことも知られている。Jack smelt, *Atherinopsis californiensis*についてF. N. Clark (1929) は30%が年輪を示さないと報告している。現在までワカサギについては年令査定は総て鱗相によつて行われて来た。このことはワカサギの鱗が年輪として十分信頼性があることを示す。しかしこのことは海より遡上して来る群のないことが必要条件である。即ち遡上ワカサギが1年魚か2年魚か(多分は1年魚であろうが確実な資料がない)は明確でないが湖水のワカサギの年令査定を鱗に依つて行うことを不可能にする原因となる。併しこれは遡上ワカサギの生活史を追究することにより更に確実性をますと考えられる。

摘　　要

1）網走湖産ワカサギは体長から1年魚、2年魚及び3年魚に分けられるが、
2）鱗相から見ると年輪のない魚体で体長の大きさが2年魚に相当するものが多数見られる。
3）これは海から網走川に遡上し更に湖に入るワカサギであり、これが鱗による年令査定を不可能にする原因である。
4）体長が同一で鱗相から2年魚と3年魚の異る年令を示すのは海より遡上産卵し以後湖水に棲息するワカサギのあることを示す。
5）湖水のワカサギの脊椎骨数は年により変動する。
6）網走港、附近海岸、網走川及び藻琴沼で漁獲されたワカサギの脊椎骨数は同一である。

文　　献

1）雨宮育作、桧山義夫　1940．公魚の産卵及び年令に就いて。水産学会報，8巻1号，45～62頁
2）Clark, F. N. 1929: The life history of the California jack smelt, *Atherinopsis californiensis*. Division of Fish and Game of California, Fish Bull. No. 16, pp. 1～23.
3）Hubbs, C. L. 1934: Racial and individual variation in animals, especially fishes. American Naturalist. Vol. 58, pp. 115～128.
4）浜田啓吉 1953: ワカサギの生態学的研究、第1報ワカサギの鱗相の地方的差異に就いて。第2報石狩川の旧及び現水路のワカサギに就いて。日本水産学会誌，19巻2号，75～82頁
5）石田昭夫 1949: 網走湖に於けるワカサギの食性に関する研究。北水孵報告，4巻2号，47～56頁
6）小林久雄 1936: 鱗相によつて判明するワカサギの生態、科学，6巻3号，100～102頁
7）Meek, A. 1916: Migration of fish. London. p.139.
8）松崎多次 1916: 公魚の年令と成長度。水産研究誌。9巻1号，12～14頁
9）元田　茂 1950: 北海道湖沼誌。北水孵報告。5巻1号，12～14頁
10）佐野誠三 1937: 網走湖の主なる棲息魚に就いて。鮭鱒彙報。9巻34号，7～16頁
11）SATO, R. 1950: Biological observation on the pond smelt, *Hypomesus olidus* (*PALLAS*), in Lake Kogawara, Aomori Prefecture, Japan. 1. Habits and age composition of the spawning fishes. Tohoku Jour. Agr. Res. Vol 1, No.1, pp. 87～95.
12）…… 1951: Influence of natural environmental conditions of the vertebral number of the pond smelt, *Hypomesus olidus* (*PALLAS*). Tohoku Jour. Agr. Res. Vol. 2, No. 1, pp. 127～133.
13）佐藤隆平、加藤浩、甲地武夫、1950: 青森県小川原沼の水産開発調査、第1報ワカサギの産卵習性と其の保護。青森県水産資源調査報告。1巻，224～233頁
14）白石芳一 1952: 諏訪湖産ワカサギ（*Hypomesus olidus*）の標識による産卵移動調査並に湖河の生態に就いて。淡水研報告。1巻1号，26～40頁
15）柳本斗夫 1916: 公魚の年令に就いて。水産研究誌。9巻3号，18～19頁

（水産科学研究所業績、第161号）

スルメイカの生化学的研究

第3報　「スルメイカ」筋肉の塩基性物質について

吉村克二・柴田　猛

（水産生物化学教室）

BIOCHEMICAL STUDIES ON "SURUME IKA" (*Ommastrephes sloani pacificus*)

III. ON BASIC SUBSTANCES IN MUSCLE OF SQUID

Katsuji YOSHIMURA and Takeshi SHIBATA

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The authors have studied the distribution of nitrogen and the qualitative results of examination by paper chromatography of amino acids and basic substances in the hot water soluble extracts of squid muscle. The results were as follows:

1) The non protein nitrogen contained in the hot water soluble extracts yields 0.8～0.9% against fresh muscle.
2) The volatile nitrogen content shows 0.02～0.03%.
3) The nitrogen content precipitated by phosphotungstic acid shows 0.4～0.5% contents in histidine, arginine, and lysine fraction are 0.1% against fresh muscle.
4) Mono amino nitrogen shows 0.2～0.3%, being less value than basic nitrogen.
5) Substances found by paper chromatography are histidine, arginine, lysine, proline, and choline. Lysine also is found by lysine picrate.

緒　　言

前報[1][2]に報告したスルメイカの生化学的研究の一環として筋肉のエキス成分、特に含窒素物質の窒素分布を主とし、二三の塩基物質及びアミノ酸のペーパークロマトグラフによる定性的結果を報告する。

これらの含窒素物質は窒素の含まない有機化合物とアンモニヤとの転移置換により、又既につくられている窒素化合物の二次的変化によつて生ずると認められているが、その生理的意義が、含窒素物質の多様性のために種々様々で、プトマインの中毒作用、特殊アミンの薬物的効果や、エキスとしての臭味に関係すると信ぜられているが、それが、生体自身にとつて、代謝上どれだけの意味をもつかについて二三の物質以外は余り報告されていない。

イカ筋肉の含窒素物について以前に鈴木、吉村両氏[3]が鰯（*Ommastrephes*. sp.）を使用しベタイン、キサンチン、ヒポキサンチンの存在を報告し、奥田氏[4]は筋肉の非蛋白質の抽出物として、アミンを含めて三十数種の物質の存在を述べている。

スルメイカも例に洩れず、多種のアミンを含み、鈴木、吉村両氏は、濕アルコール、水にても分離法を変じても常に多量のベタインを得るので遊離の状態ではないかと報告しているが、生体内でこの遊離の状態が如何なる役割をするかについては不明で、メチル基の転移に関与し、又トリメチルアミンの発生母体とも考えられ、コリンからもトリメチルアミンが発生することから、この間の関係の究明を目的としてこの研究を行つた。前述の如く色々の種類の含窒素物が存在すると考えられるので、先づ含窒素物質の種類とその数を決定する必要上、Kossel Kutscher の分離法を採用した。

実験及び考察

試料は函館近郊にて捕獲されたスルメイカ（*Ommastrephes sloani pacificus*）を用いた。イカ筋肉を細切し、皮ごと倍量の水にて十分間煮沸し、更に肉片を肉挽器にかけて二回倍量の水で煮熟抽出する。この抽出液を集め、三塩化酢酸を沈澱が生じなくなる迄加える。パルプ濾過し、透明液を湯浴上にて濃縮シラップにして実験に供した。濃縮物のpHはアンチモン電極にて6.08の値を示した。夏イカ及び秋イカについて全窒素及び熱湯可溶の非蛋白態の窒素を第1表に示した。

Table 1. Nitrogen Content extracted by hot Water.

	Squid in Summer	Squid in Autumn
	% on Fresh Musle	% on Fresh Musle
Total-N (1)	2.81	3.10
Non-protein-N (2) extracted by hot Water	0.91	0.87
ratio of (2) to (1)	32.2	28.4

溶出窒素は季節による相違は余り認められない。

この溶出非蛋白の抽出物には、アミノ酸、アミン等の塩基物質の他にグリコーゲン、その他酸性物質も含まれると考えられるので、酸—アルカリの滴定曲線を求めてみた。結果は第1図に示した。

結果によると、抽出物のpH＝6.08でアルカリ滴定の際は、アルカリ添加と共にpHの増加がみられ、pH 6～9までは△pH＝0.5で上昇し、pH＝10以上ではpH上昇がゆるくなつている。酸滴定では、pH 6～3までは、急に減少し、3以下は緩かになり、アルカリ側よりも一層平である。この曲線は蛋白の滴定曲線と同じ傾向を有する。これは抽出物の多様性を示し、カルボキシル基及びアミノ基の解離を示すが、特殊な解離を示す物質はこの曲線よりは見られないと思われる。

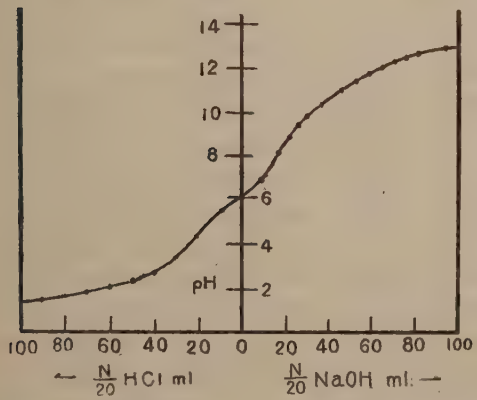


Fig.1 Acid-Base Titration Curve of the Extract.

次に揮発性塩基物についての測定を減圧法にて行つた結果は第2表に示した。

Table 2. Volatile Nitrogan Content

	Squid in Summer		Squid in Autumn	
	% on Fresh Muscle	%	% on Fresh Muscle	%
Non protein-N extracted by hot Water	0.91	100	0.87	100
Volatile-N	0.02	2.2	0.03	3.4

揮発性窒素は季節による差もなく、唯熱湯可溶性非蛋白態窒素に対する割合だけが変つている。

更に揮発性窒素の定性的分別を行わんために、アルカリ部分中和法[5]により水蒸気蒸溜を行い、pHの差による揮発性成分差を求めた。その窒素分布は第2図に示した。

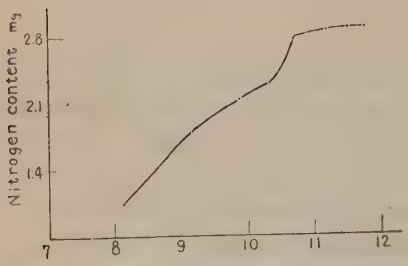


Fig. 2 Volatile N Difference by Method of Partial Neutralization.

結果よりみれば、pH 10.4～10.6 の間でやゝ急激に窒素量が増加するが、以後は左程変化がみられない。各 pH の溜分、及び時間差による各溜分について、脂肪族アミンの定性反応のネスラー反応、カルバミン反応、ニトロプルシツド反応、マイヤー反応等の定性反応を試みたが、第一、第二、第三級アミンの区別がみられず、アンモニヤだけが認められた。アンモニヤを黄色酸化水銀で除去してみたが、相違はみられなかつた。試料が微量なためかも知れない。

アンモニヤを除去した非揮発性残渣より、10%硫酸酸性で燐タングステン酸で塩基性物質を沈澱させ、燐タングステン酸をバリタ及びアミルアルコール—エーテル混合物にて分解し、Kossel-Kutscher の硝酸銀沈澱法による分別を試みた。各区分の窒素分布を第3表に示した。

Table 3. Distribution of Nitrogen Content in each Fraction precipitated by Kossel-Kutscher's Method.

	Squid in Summer		Squid in Autumn	
	% on Fresh Muscle	%	% on Fresh Muscle	%
Non-protein-N extracted by hot water	0.91	100	0.87	100
Basic fraction-N precipitated by phospho-tungstic acid.	0.52	57.1	0.41	47.0
Histidine-fraction-N	0.12	12.9	0.09	10.0
Arginine-fraction-N	0.13	14.0	0.13	15.2
Lysine-fraction-N	0.15	16.6	0.10	11.5
Mono-amino-N	0.26	29.2	0.20	23.3

この場合も、季節による変化は生原料に対しては認められない。燐タングステン酸によつて沈澱するヂアミノ態の部分の窒素が半ば近くの分布を示す。清水、竹田両氏[6]によると、その量はカツオ、マグロに匹敵し、この点でイカのエキス窒素の性格が赤色肉類に類似するとの事である。又イカの甘味はモノアミノ酸によると言われるが、窒素分布よりみればさして大きな量的位置を示さない。試料にしたスルメイカが他の種類のイカより甘味が乏しいとされているが、量的関係より成立するかも知れないが、質的な面よりみれば、一概には言えないだろう。

ヂアミノ区の区分別による窒素分布は三区ともさして差はみられない様であるが後述のペーパークロマトグラフによればリジン区分が可成りの物質を含んでいる様に思われる。清水氏の言うフミン窒素も可成り多い。更にヒスチヂン区分にはプリン塩基が含まれるので、pH3.5で硝酸銀による分別を行つた。結果は第4表に示す。

Table 4. Nitrogen Contens of Purin Base in Histidine Fraction

	Squid in Summer		Squid in Autumn	
	% on Extract-N	%	% on Extract-N	%
Histidine-fraction-N	12.9	100	10.0	100
Purin Base-N	2.0	15.5	1.7	17.0
Filtrate-N	5.5	42.1	3.6	36.0

前表と同様に、こゝでも脱銀による窒素損失が抽出物窒素の 0.2～0.5% に及ぶ。

又ヒスチヂン区分について硫酸銀によ

りイミダゾール区分の分別を行つた結果が第5表になる。

Table 5. Distribution of Nitrogen Content precipitated by Mercury Sulfate in Histidine Fraction

	Squid in Summer		Squid in Autumn	
	% on Extract-N	%	% on Extract-N	%
Histidine-fraction-N	12.9	100	10.0	100
Mercury sulfate precipitate-N	4.1	32.0	2.6	26.0
Mercury sulfate filtrate-N	7.3	56.3	5.7	57.0

硫化水銀による窒素の損失はこゝでも0.3～0.5%に及ぶ。どの形態の窒素が損失するか判明しない。

更に上記区分についてヒスチヂンを定量的に測定するために、Paulyのヂアゾ法[7]を用いて、ヒスチヂンを定量した。結果は第6表に示した。

Table 6. Histidine Content in Histidine Fraction

	Squid in Summer	Squid in Autumn
	mg. % on Fresh Muscle	mg. % on Fresh Muscle
Total-Histidine Content	3 6	4 9
Histidine Content in Fraction precipitated by $HgSO_4$	2 1	2 6

結果によると、ヂアゾ呈色物質中60%だけがヒスチヂンとして測定される。ヒスチヂン窒素はこの区分の全窒素の23%前後に相当することになる。残りの窒素はイミダゾールの1の位置に置換基をもつた誘導体か又は芳香族の含窒素化合物になる。硫酸水銀沈澱区分以外にも呈色物質が含まれ、すべて呈色物質をヒスチヂンと考えても、ヒスチヂン窒素はこの区分の全窒素の10%しかしめさない。それで芳香族の窒素化合物も相当多量に含まれているのではないだろうか。後述のペーパークロマトグラフによるとヒスチヂン以外のスポットもみられる。

次にアルギニン区分について坂口反応によるアルギニンの定量[8]を行つた。結果は第7表に示す。

Table 7. Arginine Content in Arginine Fraction

	mg. % on Fresh Muscle	$\frac{\text{Arginine-N}}{\text{Arginine fraction-N}} \times 100$
Squid in Summer	385	97.8
Squid in Autumn	492	120.0

結果よりみれば、窒素分布と同様に秋イカに多く表われている。アルギニンとして計算すると、アルギニン区分の全窒素以上になるので、アルギニンより窒素含量の少い呈色物質が含まれることになる。ペーパークロマトグラフでもアルギニン以外のスポットがみられる。

更に確認するためにアルギニン区分について、非水溶液にて滴定を試みた。水溶液と異なり、弱いアミンでも塩酸の如き強酸にて滴定される。[9] アルギニン区分をpH3.5にバリタで中和し、濃縮し、窒素に対して0.02モルに相当する量を氷酢にとかし、飽和甘汞電極にて電位差を0.1規定過塩素酸を滴定して測定する。第3図に滴定曲線を示した。

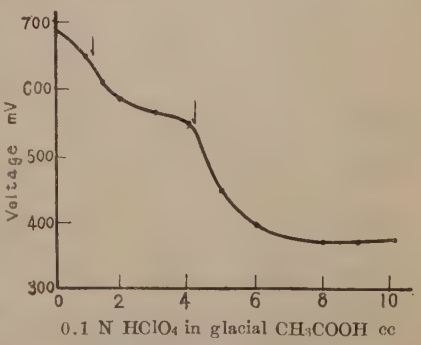


Fig. 3 Titration Curve of Arginine Fraction in Glacial Acetic Acid.

第3図より判断すると、アルギニン区分には、二つの変曲線がみられるので、解離恒数の異なつた二種の

窒素化合物が存在すると思われる。定量的滴定と正確な pH 値を得なかつたので、この二点に由来する解離恒数が決定出来ず従つて物質の存在の可能性を得たが、確認が出来なかつた。ヒスチヂン、リジン区分の滴定曲線については目下研究中である。

以上の如き窒素分布だけではどんな種類の物質が含まれるか決定出来ないために、各区分についてペーパークロマトグラフによる定性的研究を試みた。試料は苛性ソーダにて中和し、濃縮し、アルコールにて無機塩を除去しイソプロピールアルコール溶液にとかしたものを使用した。溫度は 30°C の恒溫槽にて行つた。溶剤はブタノール、ルチジン、フエノール等を用いた。

イ）熱湯抽出物の加水分解物について

熱湯抽出物を三塩化酢酸で脫蛋白をしたが、尙低分子のペプタイドを含む可能性があるので塩酸加水分解物についてペーパークロマトグラフを行つた。図を第4図に示す。判明したスポットは6個で3個の尙未確定のスポットが存在する。そのスポットがどんなものに相当するかは未だ研究中である。

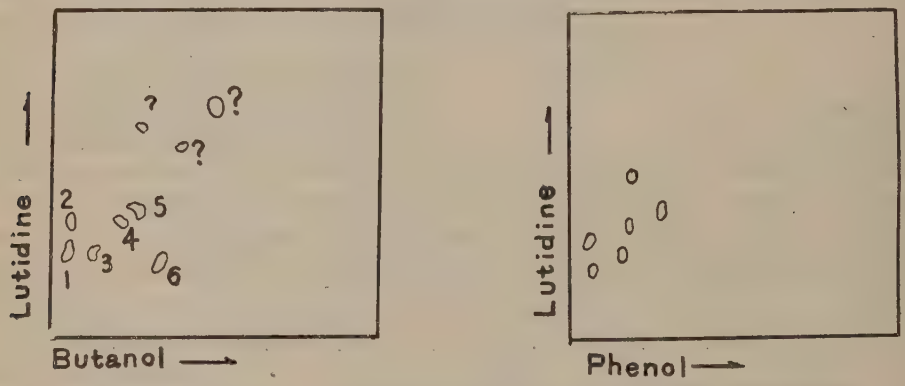


Fig. 4 Paper Chromatography of the hydrolysed Extracts.

ロ）各区分に於けるペーパークロマトグラフ

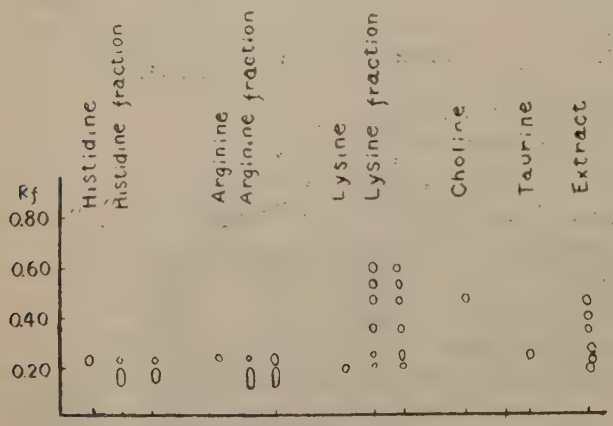


Fig. 5 Paper Chromatography of the Extract.
Solvent : Butanol-Acetic acid
Spray reagent : Ninhydrin

各区分に於けるクロマトグラフは第5図に示した。結果によるとヒスチヂン区分には、二点のスポットがみられ、一個はヒスチヂンと一致する。アルギニン区分ではアルギニンのスポットと未確認のスポットが、1個あり、ヒスチジンのスポットに相当するらしく、Bussitの報告した如く、銀塩によるアルギニン・ヒスチジンの分離の困難性を示すのか、又ヒスタミンがアルギニン区分に表われるという報告もあるので[10] ヒスタミンかも知れない。偶然Rfがヒスチヂンと一致する。第3図の変曲点

の一つがこのものに由来するかどうかは研究中である。リジン区分がスポットが一番多く、リジン、コリン、プロリンが確認出来たが他の4個は確認中である。コリンとプロリンのスポットは一致し、赤と黄色が混合した状態になつた、又エキス中でみられなかつたスポットがこゝで表われている。尚モノアミノ酸区分では4個のスポットが認められた。他のスポットは標準物質が得られなかつたので、認定出来ず唯数だけを知るのみである。尚確認法を研究中である。リジンはリジン区よりピクラートとして完全分離出来たから、リジンの存在が確認出来る。

要　　約

スルメイカ筋肉の熱湯抽出物の含窒素物質の窒素分布とペーパークロマトグラフによる二三の定性的結果を報告した。結果によれば、

1）熱湯可溶性非蛋白態窒素は生原料に対して0.8～0.9%である。
2）揮発性窒素は0.02～0.03%である。
3）燐タングステン酸にて沈澱する区分の窒素は新鮮肉に対して0.4～0.5%を示し、ヒスチヂン、アルギニン、リジンの各区分の窒素は各々0.1%である。
4）モノアミノ酸の窒素は0.2～0.3%で塩基性の窒素より少い。
5）各区分のペーパークロマトグラフによると、全エキスには6個、アルギニン区分、ヒスチヂン区分は2個、リジン区分には6個のスポットを認めた。ヒスチヂン、アルギニン、リジン，プロリンとコリンを認め得た。

文　　献

1）吉村・久保（1952）：北海道大学水産学部研究彙報、第3巻、第3号、205頁
2）吉村・柴田（1952）：同　　誌　　第3巻、第3号、211頁
3）鈴木・吉村（1908）：東京化学会誌、第30帙、913頁
4）奥田・植松（1921）：農学会報、　200号
5）松本　　（1948）：薬学誌、　2巻、1号、94頁
6）清水・竹田（1952）：日水誌、　18巻、6号、1頁
7）R.J. Block（1951）：“Amino Acid Composition of Proteins and Foods. Analytical Methods and Results” 2nd Ed. Charles. C. Thomas U.S.A. p.51.
8）R.J. Block（1951）：ibid., p. 40.
9）N.F. Hall（1930）：J. Am. Chem. Soc., 52, 5115-28.
10）M. Guggenheim（1932）：“Die biogenen Amine” p. 405.

（水産科学研究所業績　第162号）

アルギンの製造機構に関する研究 (第2報)

遊離アルギン酸の溶解について

鈴　木　　昇 (海藻化学講座)

STUDIES ON MECHANISMS OF MANUFACTURING ALGIN (PART II) ON DISSOLUTION OF FREE ALGINIC ACID

Noboru SUZUKI

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

1) It has been customary to treat brown algae preliminarily with water, acid or other solutions to make the algin dissolve easily from the plants, although there has been little consideration of how convert algin into any certain definite form.

As algin is converted into free alginic acid by treating with hydrochloric acid, dissolution constant of alginic acid ought to be obtained and also double decompositions between free alginic acid and various salts ought to be investigated.

Measured mean dissociation constant of free alginic acid was 0.87×10^{-1}. The result was applied satisfactorily to above mentioned double decomposition (see formula (2)) in all cases. That is to say, alginic acid is dissolved into alkali alginate by every alkali salt of weak acid whose dissociation constant is less than that of alginic acid, that is, less than 0.87×10^{-1}.

2) It was proved that Na_2SO_3 was an excellent dissolving reagent of alginic acid from brown algae which had been given preliminary treatment with hydrochloric acid. In this case, besides the reaction proceeds in acid, algin is bleached by the produced SO_2 (see formula (3)).

3) Several microscopic sketches of purified Na-alginate obtained by Na_2SO_3 method are shown as Figs. 1~4.

I. 緒　　言

褐藻類からアルギンを溶解抽出するにあたつて、予め藻体を0.1n程度の稀塩酸を用いて前処理を施す方法は古くから最も普通に行われてきた方法である。従来この方法を用いてきた目的は主として、製造されたアルギンの純度や粘度を高めることに主眼がおかれてきた。即ち塩酸を用いて前処理を行うことによつて、藻体から可溶性成分を除去するとともに、藻体を軟化しアルギンの抽出を容易ならしめることについては一応その目的は達せられているが、アルギンの溶解機構を考慮して行われたものというよりは、経験を主としたものであつてアルギンの溶解機構との関連については明かにされていない。

著者はさきに第1報[1]において述べたように藻体中におけるアルギンの化合形態は極めて複雑であることから、藻体中に含まれているアルギンを、予め藻体を塩酸で処理することによつて、遊離アル

ギン酸に変えた後に、遊離のアルギン酸の抽出に最も適した溶解剤を用いて抽出することをもその目的の中に加えて塩酸による前処理を行うことを提唱するものである。

アルギン酸は水に対して極めて難溶なアルデヒド結合によるポリマンウロン酸であるから、そのイオン価数の極めて大なる多塩基酸であり、しかもそのイオン価数は決して均一ではなく連続的に変化する一連の混合物である。ポリアクリル酸に対する Kern[2] の研究によればポリアクリル酸の重合度即ちイオン価数はその解離性に殆ど影響を与えない、即ち各酸基を独立の一塩基酸とみなすことが出来ると報告している。著者は先づこの点を明かにするため本研究を行つて、アルギン酸についても、アルギン酸の解離性は均一であると仮定して何等の不都合を見出しえなかつた。即ち多価酸である高分子電解質における各酸基が同一性を有するならば、換言すれば各酸基を独立の一塩基酸と見做しうるならば、その解離度に無関係に (1) 式が成立つと考えることができる。

$$\frac{[H^+][A^-]}{[AH]}=K \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

勿論、各酸基の近傍基其の他高分子構造に基因する因子によつて影響せられることもある筈であつて当然多少の活量補正が必要なわけであるが、アルギンの製造法の研究に当つては斯る平均解離恒数については (1) 式が厳密にアルギン酸に対して適用されるか否かが問題ではないのであつて、此の式が実際的にどの程度適用しうるかゞ問題である。著者はこの点を明かにすべく研究した結果 (1) 式によつて測定して得た平均解離恒数と、複分解によつて内挿的に得られたその値との間に一致を見、且つ実際に藻体からのアルギンの抽出に応用して何等の不都合を見出しえず、その結果従来用いられていなかつた多くの塩類が藻体からアルギンを製造するのに使用することができることを知つたので茲に報告する次第である。

本研究は研究費の一部を文部省科学研究費に仰いだことを深謝するとともに、実験に協力せられた田村正平、羽賀勝子、平沢悦子の三君に併せて感謝する。

II. アルギン酸の平均解離恒数

アルギン酸は殆ど不溶性に近い難溶性の高分子酸であるため従来ポリアクリル酸或はセルローズグリコール酸の如く高分子酸の水溶液を作成して実験する事が困難であるので次の方法に従つた。その一はアルギン酸粉末を沸騰水中で30分間煮沸して出来るだけ溶解せしめたアルギン酸の飽和液についてキンヒドロン電極法に従つて pH を測定しその値から平均解離恒数を算出した。元来アルギン酸の重合度はその製法や原料によつて一定ではなく、従つて沸騰水の中における加熱による分子量の低下や溶出量も一定でないので、重合度を異にする即ち重合度 50乃至500 の精製されたアルギン酸について今述べた方法によつて pH を測定した。斯くして得られた値から計算された解離恒数はアルギン酸の重合度の差異による相違は殆ど認められず、その平均の値は20°Cに於て $K=0.87\times10^{-1}$ であつた。

次にアルギン酸が斯る大なる解離恒数を有するならば、アルギン酸よりも解離恒数の小さい酸のアルカリ塩との (2) 式に示す如き複分解作用によつて反応は右に進行しアルギン酸のアルカリ塩となつ

$$Alg\text{-}COOH+MA \rightleftarrows Alg\text{-}COOM+HA \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

where, Alg-COOH; alginic acid, M; alkali metal, NH_4. or Mg, A; acid radical

て溶解するものと考えられるので、遊離のアルギン酸に解離恒数を異にする種々の酸のアルカリ塩を作用せしめて、前に得た解離恒数の適用性を調べた。その結果アルギン酸との複分解作用によつてアルギン酸塩を生じて、アルギン酸を溶解せしめる塩及びその塩に対応する酸の解離恒数の中主るものを挙げれば第1表の如くであつて前に得られた解離恒数が矛盾なく適用されることが判つた。

Table 1.

Salts (MA)	Dissociation constant K, of corresponding acids (HA)
Na_3PO_4	1.1×10^{-2} (4)
Na_2SO_3	1.7×10^{-2} (4)
$(COONa)_2$	6.5×10^{-2} (3)
Rochellesalt	9.6×10^{-4} (3)
$NaNO_2$	4.6×10^{-4} (4)
HCOONa	2.1×10^{-4} (4)
CH_3COONa	1.74×10^{-5} (3)
Na_2CO_3	3.5×10^{-7} (3)
Na_2S_{2+x}	5.7×10^{-8} (3)
$NaAsO_2$	6×10^{-10} (3)
$NaBO_3$	6.4×10^{-10} (5)
$Na_2B_4O_7$	6.4×10^{-10} (5)

以上の実験で判るようにアルギン酸は難溶性であるにも拘らず可成り強い酸として作用するものであつて、その一二の例として次に示す様な反応を行わせることができる。

$$Alg\text{-}COOH + NaNO_2 + KI \rightarrow Alg\ COONa + Alg\text{-}COOK + NO + I_2 + H_2O$$

$$Alg\text{-}COOH + Na_2S_{2+x} \rightarrow Alg\text{-}COONa + S$$

其の他に多くの脂肪酸の塩類と反応し、アミノ酸とも化合物をつくり蛋白質とも結合することが明かにされたが本報はアルギンの製法についてのみ報告し、その他は別報に報告する。

Ⅲ. 塩酸前処理によるアルギンの製造

塩酸によつて前処理された藻体中のアルギンは殆ど凡て遊離のアルギン酸に変つているので、この藻体からアルギンを製造するには原理的には二法が考えられる。即ち一法はアルギン酸をアルカリで中和してアルカリ塩として抽出する方法であり、他は(2)式に従つて行われる複分解反応を利用して塩類を用いてアルギンを抽出する方法である。本報においては以下第一法を中和法、第二法を複分解法と呼ぶことゝする。

中和法においては反応は用いたアルカリの過剰によつてアルカリ性に於て進行し、複分解法においては反応によつて生じた酸によつて反応は酸性において進行する。一般に褐藻類の色素はアルカリ性に於て溶出が甚しく且つ濾過が困難であるが、酸性下においては藻体の崩壊も少く溶解液の粘性も低く操作が容易であり、しかも得られたアルギンの粘度が低下しない利点がある。今複分解法の一例を挙げれば次の通りである。

江差産ホソメコンブ *Laminaria religiosa* 10g に 0.1n HCl 150 c.c. を加え 50°C において 15分間処理した後、藻体をよく水洗し之に水 300 c.c. を加え加温し 60°C に達したときに Na_2CO_3 又は Na_2SO_3 を加え 65°Cを超えない温度において攪拌しながら 1 時間反応せしめた後水を 700 c.c.加えて濾過し、濾液の 600 c.c. をとり之に HCl(1:2) 75 c.c. を加えて生じたアルギン酸ゲルを絹布中で絞つた後 55～58°C の温水中で水洗脱酸する。アルギン酸ゲルは 55°C 以上において極めてよく緊縮するためにこの方法によつて圧搾による脱水は極めて容易に行われる。斯くして脱酸、脱水したゲルはアルコールにて更に脱水しエーテルを用いて脱アルコールした後デシケーター中で乾燥してアルギン酸を得る。この場合のアルギン酸の収量、濾過速度及び濾液の比粘度は第 2 表及び第 3 表に示す通りである。なお、濾過速度は径 15cm の大型漏斗及びコロイド用東洋濾紙を用いて自然濾過を行つたときの 1 時間の濾液量を以て示し、比粘度は濾液の一部をとつてオストワルド氏粘度計を用いて 20°C において測定したものである。

第 2 表及び第 3 表において判るように Na_2SO_3 による抽出の場合には Na_2CO_3 による場合に比較して濾過が極めて容易である。なお収量においては Na_2CO_3 による方法がやゝ勝つているが製品の着色程度が甚しい。これに反して Na_2SO_3 による法は殆んど白色に近い乾燥ゲルが得られる利便がある。アルギンのような天然高分子物質の製造においては、却々その製造条件を同一にして処理した場合に

Table 2 Digestion with Na_2CO_3

Na_2CO_3 (g)	Velocity of filtration (dl/hr.)	Specific viscosity of filtrate	Yield of alginic acid (%)
0.5	281	1.7	——
1.0	75	33.6	17,3
1.5	93	50.8	20.0
2.0	85	54.7	21.0
2.5	126	51.8	22.0
3.0	80	59.3	21.0
3.5	167	58.3	23.2
4.0	125	46.9	23.0

Table 3 Digestion with Na_2SO_3

Na_2SO_3 (g)	Velocity of filtration (dl/hr.)	Specific viscosity of filtrate	Yield of alginic acid (%)
1.0	710	1.2	——
1.5	850	1.1	——
2.0	715	3.6	——
2.5	574	7.7	15.0
3.0	316	11.8	14.2
3.5	408	19.0	17.2
4.0	350	25.7	17.0
4.5	563	10.0	18.2
5.0	——	——	19.0

於ても、攪拌や濕度其他の影響が大きく、第2表及び3表においてもみられるように、その微細な差異を論ずることは不可能である。従つて製品の粘度においても個々の実験結果について上記両法を比較することは非常に困難であつたが、数多くの実験の結果両法から得られたアルギン酸ソーダの比粘度は殆ど差がなかつた。

NaOHは褐藻からアルギンを抽出するのには従来用いられていなかつたが、塩酸前処理を施した褐藻からのアルギンの抽出には充分使用できるのであつて、前に記したと同じ方法に従つて溶解剤として水200 c.c. に1%NaOH 100 c.c. 加えて用いた結果、水で前処理を施しただけのホソメコンブからはアルギン酸は4.2% しか得られなかつたにも拘らず、この方法に於ては19.0%を得ることが出来た。

IV. 亜硫酸ソーダ法

褐藻類に対して塩酸前処理を施すときは極めて多くの塩類が、アルギンの抽出に用いられることは前に述べた通りであるが、亜硫酸ソーダを用いるときは、その反応は(3)式に示す通りであつて、

$$Alg\text{–}COOH + Na_2SO_3 \rightarrow Alg\text{–}COONa + SO_2 + H_2O \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (3)$$

反応が酸性で行われるだけでなく、茲に生じたSO_2ガスは濾液に対して防腐作用を示し、アルギン酸のゲル化に際して、酸を加えることによつて更に晒白作用が行われるので極めて有効なアルギンの製法である。第2表及び第3表においてNa_2CO_3に比してNa_2SO_3の所要量が多いのはNa_2SO_3の分子量がNa_2CO_3に比して大であるためであつて当量としては必ずしも多くを必要としていない。

次に亜硫酸ソーダ法によつて得られたアルギン酸を0.5%Na_2CO_3溶液を用いて約0.5%に溶解し、之をアルコールで沈澱せしめ再び之を水に溶解しアルコールで再沈澱を行うことを数回繰り返し行つて得たアルギン酸ソーダゲルをエーテルにて脱アルコールしてデシケーター中にいれて乾燥し、之を乳鉢中で砕いて粉末となしたものゝ顕微鏡による観察結果を図版に掲げる。図版中にはその0.5% 溶液の比粘度(η_{sp}), Heen[6]の方法に従つて得られた重合度(P)及び reduced viscosity の限界濃度(%)をも併せ記した。是等の図はアルギン研究の一つの方法として興味深いと考えられたので掲げたのであつて、之から直ちに種々の結論を導くことは困難ではあるが、アルギン酸ソーダのゲルは顕微鏡下に於て可成り複雑な分岐及び網目状構造をなしていることは興味深い。

V. 総 括

1) 従来アルギンの製造に当つては、藻体の前処理は、藻体より可溶成分、色素等を除去し、藻体

を軟化せしめることが主目的であつたが、本研究に於ては、それに加えて藻体中のアルギンの化合形態を一定にすることを重要視すべきことを明かにし、その一つの方法として塩酸による前処理によつて藻体中のアルギンを遊離の形態のアルギン酸とする方法について述べた。

2) 測定されたアルギン酸の平均解離恒数は0.87×10^{-1}であつて、更に、多数の塩とアルギン酸との複分解法によつてその適用性を検討した結果、何等不都合が見られなかつた。

3) 以上の原理を褐藻からアルギンを抽出する方法に応用して亜硫酸ソーダを用いる方法が特に優れていることを明かにした。

4) 亜硫酸ソーダ法によつて得た精製アルギン酸ソーダゲルについて顕微鏡下に観察した。

文　　献

1) 鈴木　昇：本誌 3 No. 4 243 (1953)

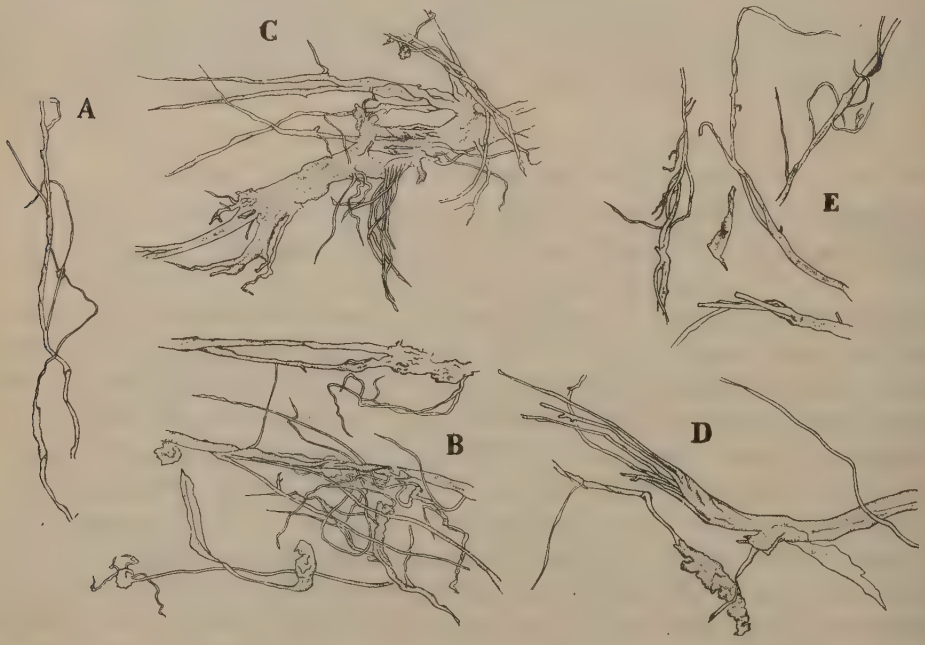
2) Kern, W : Z. Phy. Chem. (A) 181 249 (1938)

3) Kolthoff, I. M. and E. B. Sandell : Text Book of Quantitative Inorganic Analysis (1936)

4) 高木誠司訳：コルトフ容量分析の理論 附録 (1946)

5) 物理化学同好会編：化学恒数表 (1948)

6) Heen, E : Koll. Ztschr. 83 204 (1938)



	A	B	C	D	E
Specific viscosity of 0.5 % Na-Alginate solution	175.3	397.3	60.1	68.5	165.0
Degree of polymerization	155	352	460	639	675
Critical concentration in reduced viscosity (%)	0.15	0.032	0.10	0.05	0.10

(水産科学研究所業績 第163号)

アルギンの製造機構に関する研究 (第3報)

アルギン酸カルシウムの複分解による溶解について

鈴　木　　昇 (海藻化学講座)

STUDIES ON MECHANISMS OF MANUFACTURING ALGIN (PART III) ON DISSOLUTION OF CALCIUM ALGINATE BY DOUBLE DECOMPOSITION

Noboru SUZUKI

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

It has been proved the greater part of algin in brown algae exists as Ca-alginate. The author detected the existence of Ca alginate as intercellular substance of parenchymatous and medullary cells of *Laminaria angustata*, *L. longissima* and *L. ochotensis* through microchemical observation, where calcium was detected with oxalic acid and Ca-alginate with KI_3-H_2SO_4 solution.

Ca alginate ought to be converted into soluble alkali alginate following the formula (1), when solubility product of CaA is less than that of Ca-alginate. The above mentioned idea was confirmed by the investigation of double decomposition. Table 1 shows some examples of alkali salts, by which Ca alginate is dissolved into alkali alginates.

The solubility product of Ca-alginate should be considered as of the order of 10^{-6} through the investigation of double decomposition.

I. 緒　　言

先に第1報[1]及び第2報[2]に於て述べたように褐藻中のアルギンの化合形態は複雑であるが、尠くともその相当大部はアルギン酸カルシウムの形で存在していると考えられている[3][4][5]。褐藻類からアルギンを抽出するに当つては、藻体中のアルギンの化合形態を前処理によつて先づなるべく一様にすることが望ましいことは前に述べた[1][2]。本報に於ては、藻体中のアルギンを前処理によつてアルギン酸カルシウムに変化せしめた後アルギンを抽出する方法について報告する。

本研究はその研究費の一部を文部省科学研究費に仰いだことを玆に深謝するとともに実験に協力せられた小黒美樹、田村正平両君に謝意を表する。

II. 藻体中に於けるアルギン酸カルシウムの存在

先にも述べたように褐藻中には尠くとも相当大部のアルギンがアルギン酸カルシウムとして存在していると考えられ、三輪[5]も顕微鏡化学的にカルシウムを修酸カルシウムの結晶として検出している。

著者が日高産ミツイシコンブ *Laminaria angustata* の凍結切片について 0.5% 修酸による修酸カルシウムの結晶を顕微鏡化学的に観察した結果は第1図及び第2図の通りである。第1図は柔細胞のものであり第2図は繊維状細胞のものであつて、両図ともカルシウムは主として細胞膜間物質中に含まれていることを示している。アルギンは細胞膜間物質であると考えられるから、このカルシウム

の結晶は主としてアルギン酸カルシウムの存在によるものと考えられる。次に同じく凍結切片を1% H_2SO_4 1c.c.中に浸し次で KI_3 溶液（5% KI溶液100c.c.中に沃度1gを溶かしたもの）2c.c.中に浸漬した後、水洗してその呈色を検鏡した，本呈色反応は数多くのアルギン酸及びアルギン酸カルシウムのゲルについて検討した結果アルギン酸カルシウムのゲルに於てよく青色に呈色することを確めえたので本法を用いた，その検鏡の結果は第3図の通りであつて柔細胞にあつては細胞膜間にアルギン酸カルシウムの存在が予想される，次に切片を予め 0.5% $CaCl_2$ 溶液中で15分間煮沸したものについて検鏡すれば呈色が一層明瞭であることは第4図に示す通りであつて、アルギン酸カルシウムが細胞膜間に充満していることが認められる。以上4図を綜合して考察するに、ミツイシコンブ中のアルギンは相当大部はアルギン酸カルシウムとして存在しているが、然しなお $CaCl_2$ によつて置換されてアルギン酸カルシウムに変りうるアルギンも可成り存在していることが認められる。

Ⅲ. アルギン酸ソーダよりアルギン酸カルシウムの生成

三輪[5]はワカメ *Undaria pinnatifida* より抽出した純アルギン酸ソーダから $CaCl_2$ を用いて、アルギン酸カルシウムを調製してその二三の性質を調べているが、このアルギン酸カルシウムは塩素の反応なく、結合しているカルシウムの量は $C_6H_7O_6\frac{1}{2}Ca$ より計算せられる量即ち 10.25% よりは僅かに尠く 9.7% であつた，更に三輪はアルギン酸ソーダ溶液に過剰の $CaCl_2$ を加えて生じたゲルを透析に付してアルギン酸カルシウムを得た．このものはカルシウム含量が極めて多く約21%に達するが、完全に塩素の反応はなく従つてゲル中に $CaCl_2$ が混合しているものではなく、カルシウムは恐らくアルギン酸のアルコール基とも結合しているのではないかと述べている。なお三輪はカルシウム含量の多いアルギン酸カルシウムと前に述べたカルシウム含量の少いアルギン酸カルシウムとの両者について Na_2CO_3, NH_4OH, NaOH 等の水溶液に対する溶解性について検討した結果是等の溶剤に対して特別の差異のないことを認めている。

著者は0.5% アルギン酸ソーダ溶液に5%醋酸カルシウム溶液を種々の量に加えて生じたアルギン酸カルシウムゲルを蒸溜水中に浸漬して水中に Ca^{++} の検出を認めなくなるまで透析した後、ゲルをアルコールにて脱水、エーテルにて脱アルコール後乾燥したものについて、カルシウムの結合量を分析した結果は7～20% の間にあるものが得られた，常に一定のカルシウム含量のアルギン酸カルシウムを得ることは困難であつたが、カルシウム含量 9.7乃至 11.5%のものについて、以下述べる種々の溶解性について検討したが差異を認め得なかつたので、以下の実験はカルシウム含量が $C_6H_7O_6\frac{1}{2}Ca$ としての計算値にできるだけ近いもの即ち 9.8乃至 10.5%の試料について行うことにした。

Ⅳ. 複分解によるアルギン酸カルシウムの溶解

先に第1報[1]に述べたようにアルギン酸カルシウムは (1) 式に従つて複分解反応によつて生ずべき

$$Ca\text{-}Alginate + MA \rightleftarrows M\text{-}Alginate + CaA \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \quad (1)$$

where, M : alkali metal, NH_4, Mg etc, A : acid radical

CaA の溶解積が Ca-Alginate の溶解積よりも小であれば反応は右に進行しアルギン酸カルシウムは可溶性のアルギン酸塩となるべきである。このためには Ca Alginateの溶解積を直接測定すべきであるが、一定組成のアルギン酸カルシウムをつくることが不可能であつたので間接法を採用した。即ち溶解積既知[6][7]の難溶性カルシウム塩のカルシウムをアルカリ金属に置き換えた塩類を用いて、之をアルギン酸カルシウムに作用せしめてその溶解性を検することによつて (1) 式から逆にアルギン酸カルシウムの溶解積を内挿法によつて推定する方法をとつた、実験の結果アルギン酸カルシウムを溶解

する作用のあることの認められたアルカリ塩の主なるものは第1表に示す通りである。なお NaOH, KOH 等はアルギン酸カルシウムを溶解する作用は認められなかつた。以上の結果より見ればアルギン酸カルシウムの溶解積は$Ca(OH)_2$よりは小であると考えられる。$Ca(OH)_2$の溶解積は溶解度[6]より計算するに、濃度によつて多少の差異があるが、1×10^{-5}～2.4×10^{-5}程度であつて、このことからアルギン酸カルシウムの溶解積は1×10^{-5}よりは小さいものと考えられる。第1表の塩に対するカルシウム塩の溶解積は Kolthoff 等[8]による値或は Seidell[6,7]による溶解度より計算してもいづれも10^{-6}～10^{-7}以下のものである。従つてアルギン酸カルシウムの溶解積は恐らく数位10^{-6}のものと考えられる。

Table 1

Na_2CO_3, Na_2HPO_4, Na_3PO_4, $(COONa)_2$
Na_2SO_3, NaF. $Na_2S_2O_3$, K_2CO_3 KIO_3,
$KSiO_3$, Rochellesalt, $K_4Fe(CN)_6$ etc.

(1)式に示した様な複分解反応に於ては生成された CaA によつて一般に溶解液は白濁するのであるが、第1表に掲げた塩類中$Na_2S_2O_3$, ロッシエル塩等は溶液の白濁が認められない。このことは$Ca_2S_2O_3$, 酒石酸カルシウム等は夫々対応するアルカリ塩の過剰の存在によつて極めて錯度の高い錯塩を作ることが知られているので[6]そのために液は白濁しないものと考えられる。なお、アルギン酸カルシウムが溶解剤によつて溶解される状態は必ずしも一様ではなく、例えば全く加熱をしなくとも一様に溶けるもの〔Na_2CO_3〕, 一様には溶けるが加熱をした方がよく溶けるもの〔Na_2SO_3〕, 加熱をしなくとも溶けるが溶解する前一旦アルギン酸カルシウムが著しく膨化してから溶けるもの〔$(COONa)_2$〕, 或は加熱によつてアルギン酸カルシウムが膨化してから始めて溶けるもの〔Na_2HPO_4〕等がある。

V. $CaCl_2$溶液前処理法による藻体からアルギンの抽出

Table 2
Yield of alginic acid obtained by different preliminary treatments

Dissolution reagent(g)	Preliminary treatment		
	Water	0.5%$CaCl_2$	0.1nHCl
$Na_2CO_3$2.0	21.2	22.2	20.0
$Na_2SO_3$3.5	18.0	18.5	20.6
$Na_2HPO_4$5.0	19.0	14.0	18.0
NaOH1.0	4.2	2.0	19.0

数種の溶解剤を用いて、ホソメコンブ 10g について第2報[2]所載の方法に従い、たゞ0.5%$CaCl_2$溶液を用いて80°Cに於て30分間前処理を施したものを、沸騰水中で30分、又は第2報の如く0.1nHClで前処理したものとについて抽出されたアルギン酸の収量を比較すれば第2表の通りである。

既に第2報[2]及び本報において述べたアルギンの溶解機構から NaOH によるアルギンの抽出量を第2表について検討するに、沸騰水による前処理を行つた場合に収量は4.2%であり、アルギンが藻体内に於てカルシウム塩以外の化合形態で存在していることを想像せしめる。このことから遊離のアルギン酸の存在が一応考えられるが、0.5% $CaCl_2$によつて藻体を処理してもなお2%のアルギンが抽出されることから、藻体内のアルギンの化合形態の複雑であることが予想される。

文　　献

1) 鈴木　昇：本誌 3 No.4 243 (1952)
2) 鈴木　昇：本誌 4 No.1 60 (1953)
3) Kylin, H : J. Physiol. Chem. 94 335 (1915)
4) Bird, G. M. and P. Haas : Biochem J. 25 403 (1931)
5) 三輪知雄：日本植物学輯法 11 (1) 63 (1940)
6) Seidell, A : Solubilities of Inorganic and Organic Substance (1916)
7) Seidell, A : Solubilities of Inorganic and Organic Compounds (1928)

8) Kolthoff, I. M. and E. B. Sandell : Text Book of Inorganic Analysis p. 55 (1936)

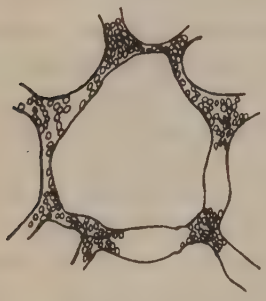


Fig. 1

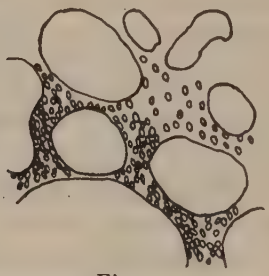


Fig. 2

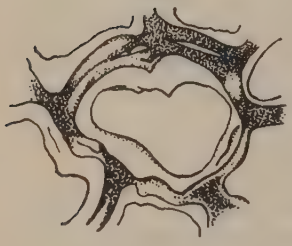


Fig. 3

Fig. 4

Fig. 1 Calcium in parenchymatous cell detected by 0.5% oxalic acid
Fig. 2 Calcium in filamentous cells detected by 0.5% oxalic acid
Fig. 3 Ca-alginate in parenchymatous cell detected by KI_3-H_2SO_4 solution
Fig. 4 Ca alginate in parenchymatous cell preliminary treated with 0.5% $CaCl_2$ solution, detected by KI_3-H_2SO_4 solution

（水産科学研究所業績 第164号）

アルギンの製造機構に関する研究 (第4報)

アルギン酸カルシウムのイオン交換による溶解について

鈴　木　　昇 (海藻化学講座)

STUDIES ON MECHANISMS OF MANUFACTURING ALGIN (PART IV) ON DISSOLUTION OF CALCIUM ALGINATE BY ION EXCHANGE REACTION

Noboru SUZUKI

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

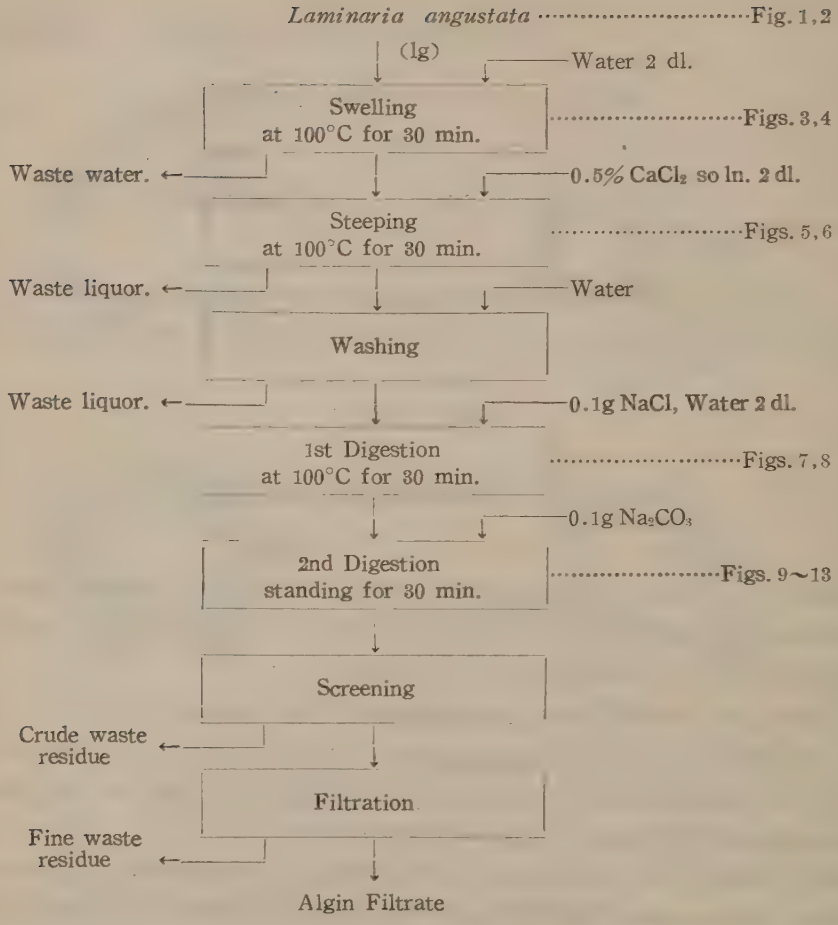
1) Besides the dissolution of Ca-alginate by double decomposition following formula (1), ion exchange between Ca ions of Ca-alginate and cations of alkali salts proceeds when solubility product of corresponding CaA is very high.

Ca-alginate was treated in various concentrations of NaCl solutions for 30min. at boilling point. The equilibriums of ion exchange between Ca ions and Na ions were shown in Table 1. In this case, 19.8% Ca ions and 9.5% of algin in Ca-alginate were dissolved through adding of NaCl 0.5g to Ca-alginate 0.7667g.

As was reported in the previous paper[1], Ca-alginate gel is precipitated from Na-alginate solution by adding excess of $CaCl_2$ solution. Therefore, to proceed reaction perfectly, $CaCl_2$ produced by ion exchange should be carried off from the system. Certain examples of these methods are shown in formulas (2) and (3).

2) Through microchemical investigation it was proved that the epidermal cells were made firm by $CaCl_2$ solution and not destroyed by further treatments in either NaCl or Na_2CO_3 solutions. Microchemical sketches of the process were shown as Plates I and II, where materials were sectioned with freezing method and stained with 1% methylene blue.

The process is set out schematically as follows; the author proposes to name this method "Suzuki's Method".



I. 緒　　言

褐藻類を塩化カルシウム溶液によつて前処理を施したのち、複分解反応を利用して、多くの塩類によつてアルギンを抽出できることについては第2報[1]に述べた通りであるが、本報に於ては、同じ前処理をを施した藻体から、イオン交換反応を利用してアルギンを抽出する方法について報告する。

本研究はその研究費の一部を文部省科学研究費に仰いだことを茲に深謝するとともに、顕微鏡化学的実験に対して種々御教示を賜つた故神田教授に深謝し併せて実験に協力せられた小黒美樹、北林昭三両君に感謝の意を表する。

II. イオン交換によるアルギン酸カルシウムの溶解

アルギン酸カルシウムは複分解反応によつて(1)式に従つて溶解せられることは前報[1]に述べた通りである。

$$\text{Ca-Alginate} + \text{MA} \rightleftarrows \text{M-Alginate} + \text{CaA} \qquad (1)$$

where, M : alkali metal, NH_4, Mg.　　A : acid radical

茲に(1)式に於て生ずべき CaA の溶解積が極めて高いときは特異の反応が見られる。即ち例えばMA としてNaCl 溶液を用いた場合においてはアルギン酸カルシウムは、殊に加溫した場合に著しく膨潤し、アルギン酸カルシウムのCa^{++}はNaCl中のNa^{+}とイオン交換せられて、アルギン酸カルシウムの一部はアルギン酸ソーダとなつて溶出してくる。今その一例を挙げれば無水物に換算して 0.7667g のアルギン酸カルシウム（無水物中の Ca 含量10.40%）をとり之に水100 c.c. 及び NaCl を 0.10乃至 0.50g添加して30分間沸騰せしめたのち、濾紙上にて濾過水洗し溶出したCa^{++}及びアルギン（アルギン酸ソーダとして計算した）を定量した結果は第1表の通りである。

Table 1.

NaCl added (g).	0.10	0.20	0.30	0.50
Liverated Ca^{++}(mg).	7.36	12.27	14.89	15.81
Dissolved Algin(mg).	25.6	44.3	45.2	73.7

此の場合用いたアルギン酸カルシウム中のCa^{++}は79.74mgであり、アルギン酸カルシウムが凡てアルギン酸ソーダに変化したとすれば774.5mgであるから、0.50gのNaClを用いた場合においては全Ca^{++}の約19.8%が溶出し、全アルギン酸カルシウムの約9.5% がアルギン酸ソーダとして溶出したことになる。この場合溶出したアルギンに比べて溶出したCa^{++}が著しく多いのは、イオン交換反応によつて遊離されたCa^{++}のほかに可溶性となつたアルギンにもなおカルシウムが結合しているためと考えられる。この反応は一般に逆反応が容易に行われることがよく知られている。即ちアルギン酸ソーダ溶液に$CaCl_2$溶液の過剰を加えるときには膨潤性の乏しいアルギン酸カルシウムのゲルを析出する。茲に生じたゲルは水中で加熱するときは更に水を失つて極めて緊縮した形となるのであつて、このアルギン酸カルシウムがNaCl溶液の過剰と加熱することによつて著しく膨潤し、且つアルギンを溶出する反応は、複分解反応ではなくしてイオン交換反応であると考えられる。このイオン交換反応はCaAの過剰が存在するときは逆反応が進行するのであるから、(1)式の反応を右に進行させるためには、こゝに生じた可溶性のCaAを何等かの方法で系外に除去することが必要である。その一二の例を挙げれば次の通りである。

$$\text{Ca-Alginate} + \text{Na-Acetate} \rightleftarrows \text{Na-Alginate} + \text{Ca-Acetate}$$
$$\text{Ca-Acetate} + (COOH)_2 \rightarrow \text{Ca-Oxalate} + CH_3COOH \cdots\cdots\cdots (2)$$

$$\text{Ca-Alginate} + \text{NaCl} \rightleftarrows \text{Na-Alginate} + CaCl_2$$
$$CaCl_2 + Na_2CO_3 \rightarrow CaCO_3 + \text{NaCl} \cdots\cdots\cdots (3)$$

(2)式に於ては加えた酢酸によつて醋酸カルシウムは酢酸カルシウムとなり反応は直ちに右に進行するが、この場合に酢酸の過剰を用いることはアルギン酸の析出を見るおそれがあるから酢酸は反応の進行に従つて徐々に加えるべきで、過剰に陥らない様注意する必要がある。(3)式の場合は結果から見ればNa_2CO_3を単独に用いたのに等しくみえるがNa_2CO_3の量は遙かに少くてすみ、この方法を藻体からのアルギンの抽出に用いた場合は後に述べるように、$CaCl_2$によつて固定された表皮細胞が過剰のアルカリの添加によつて破壊されるのを防ぎ、そのために色素の溶出が防がれ且つ抽出されたアルギンの粘性の低下も少い利点がある。

III. 顕微鏡化学的観察

前に述べた(3)式を利用した方法について以下述べるように顕微鏡化学的観察を行つた。

実験方法としては、ミツイシコンブ *Laminaria angustata* を約5mm角に細切し、この約1gをとつて以下記す如き処理を施したのち、その凍結切片をつくり1% methylene blue 溶液で染色して検鏡した結果は第1乃至第13図に示す通りである。処理方法を図の順を追つて説明すれば次の通りである。第1図は原藻を吸水膨化せしめたものゝ断面を低倍率にてみたものであり、第2図はその柔細胞の拡大図である。原藻1gを沸騰水 200 c.c. 中で30分間煮沸したものゝ検鏡結果は第3,4図の通りである。全体としては可成り膨化しているが第4図に見られるように柔細胞は却てやゝ硬化していることが判る。これはアルギン酸カルシウム等の不溶性なアルギン酸塩は一般に熱湯の中で緊縮硬化する性質を有しているので、細胞膜間の不溶性アルギン酸塩が脱水硬化したためではないかと思われる。次に沸騰水で処理した残藻体に0.5%$CaCl_2$溶液 200c.c.を加えて30分間 100°C において処理したものゝ検鏡結果は第5,6図の通りである。第5図で判るように$CaCl_2$溶液で処理すると藻体は全体が著しく固化収縮して色素層は固定されるが柔細胞の細胞膜は沸騰水の処理によるよりも更に緊縮している。次に$CaCl_2$溶液を除いて水洗した藻体に0.1gのNaClと水 200c.c. とを加えて30分間 100°Cにおいて処理を施した結果は第7,8図に示す通りである。この処理によつては藻体は著しく膨化するが藻体は崩壊するに至らず原形を保つている。このとき第7図でも判るように前に固定された表皮細胞の色素細胞は全く原形を保つているが浸漬液は粘稠となつてアルギンの抽出されたことを示し、色素の溶出は全く見られない。藻体内部の柔細胞は第8図で判るように、アルギン酸カルシウムがNaClによつて陽イオン交換をうけて著しく膨化しそのために細胞膜が破れ、こゝから可溶性となつたアルギンの溶出したことを示している。更にこの浸漬液を棄てることなくこの液に 90°C に於てNa_2CO_3 0.1g を加えそのまゝ加温することなく、緩徐に30分攪拌して検鏡した結果は第9～13図の通りである。この場合先に固定された色素を含む表皮細胞は全く破壊されず、柔細胞及び繊維状細胞内のアルギン酸カルシウムのみが(3)式に従つて可溶性アルギンとなつて溶出してくる。比較のため他の抽出法をも検討することを試みたが孰れも藻体が崩壊して検鏡出来る凍結切片をつくることが不可能であつた。第9図及び第12図は$CaCl_2$溶液によつて固定された表皮細胞が、夫れ自体何等崩壊することなく藻体から剝離してゆく有様を示すものである。第10図はこのようにして剝離された表皮細胞の拡大図であつて色素が固定されたまゝであることが判る。第11図並びに第13図は藻体内部の溶壊状態を示すもので第11図はその初期を第13図は全く崩壊した繊維状細胞を示すものである。第13図のように内層や随層が全く崩壊しても表皮細胞の色素は固定されて表皮細胞は全く崩壊しない。斯る顕微鏡的観察はミツイシコンブのほかにナガコンブ *Laminaria longissima*, リシリコンブ *L. ochotensis* についても行つて全く同様の結果が得られたが茲にはミツイシコンブの場合だけを示した。斯る一連の操作によつて表皮細胞は固定されたまゝアルギンが抽出されるので、表皮は剝離せられて液の分離は極めて容易であり、実験室に於ては、ガーゼを用いて不溶解性の繊維質及び表皮が除去されるので、その後の濾紙パルプによる濾過操作も極めて容易である。元来アルギン酸ソーダ溶液自体は粘度が大であるにも拘らず濾紙パルプによる濾過は容易なのであるが、表皮其他藻体中のアルギン以外の粘質物の存在によつて著しく濾過が阻害されるのであつて、本法の如くイオン交換作用を利用するときは、表皮は残留し他の粘質物の溶解も少いので濾過は極めて容易であり、且つ色素の溶出は殆ど見られず何等精製を行わなくても純白のアルギンを析出せしめることが出来る。

Ⅳ. 考　察

塩化カルシウムによつて藻体を前処理することによつて藻体中のアルギンを大部分アルギン酸カルシウムに変化せしめたのち NaCl 溶液で処理し、アルギン酸カルシウムと NaCl との間に陽イオンの交換を行わしめこの際生じた $CaCl_2$ を Na_2CO_3 で系外に除くことによつて、褐藻類の表皮細胞を溶壊せしめることなく藻体から剝離せしめ、内層及び随層の細胞膜間に存在するアルギンのみをアルギン酸ソーダとして抽出することを顕微鏡化学的に研究した。本法によれば表皮細胞中の色素の溶出を見ることがなく、且つ表皮や粘質物の溶解せられることがないので濾過も極めて簡単であり、而も Na_2CO_3 の使用量も少量でアルギンを抽出することが出来るのでアルギンの製法としては極めて優秀であることが判つた。

本法によるアルギンの製法を今後鈴木式アルギン製造法と呼ぶことゝする。

文　献

1) 鈴木　昇：本誌 4 No.1 60. (1953)

Plate　I

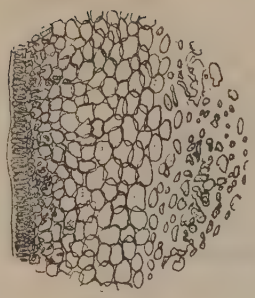


Fig. 1

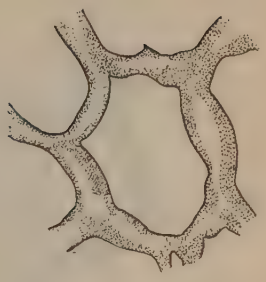


Fig. 2

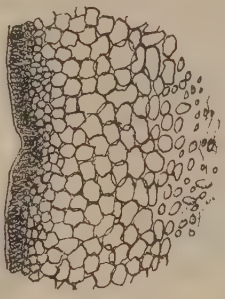


Fig. 3

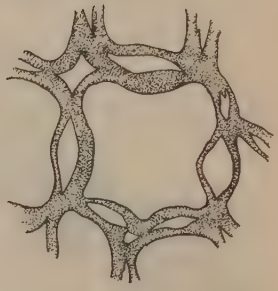


Fig. 4

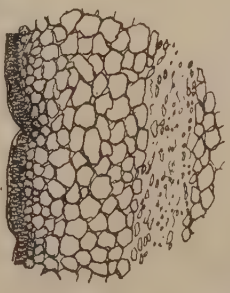


Fig. 5

Fig. 6

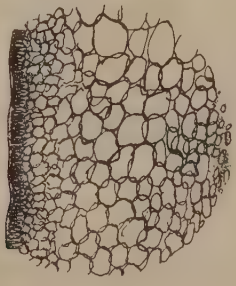


Fig. 7

Fig. 8

Plate II

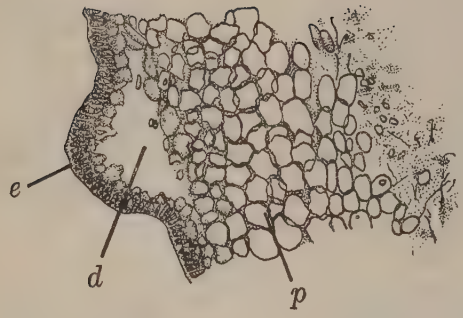


Fig. 9

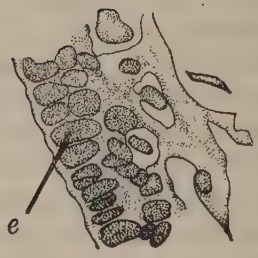


Fig. 10

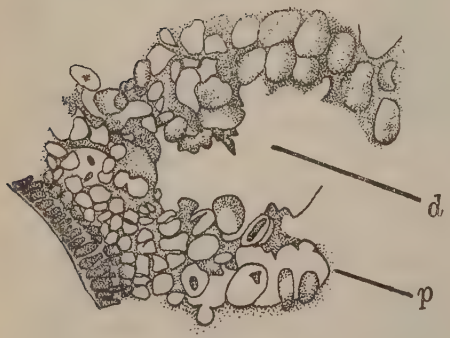


Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13

Explanation of plates (*next page*)

Explanation of Plates

Fig. 1 Whole view of non-treated section of *Laminaria angustata*

Fig. 2 Non-treated parenchymatous cell

Fig. 3 Whole view of the section treated with boiling water for 30 min.

Fig. 4 Parenchymatous cell treated as same as Fig. 3

Fig. 5 Whole view of the section treated further with 0.5% $CaCl_2$ solution at 100°C for 30 min.

Fig. 6 Parenchymatous cell treated as same as Fig. 5

Fig. 7 Whole view of the section treated further with 0.5% NaCl solution at 100°C for 30 min.

Fig. 8 Parenchymatous cell treated as same as Fig. 7

Fig.9～Fig.13 Views of further treated with 0.5% Na_2CO_3 solution at 90°C for 30 min.

List of reference letters

e; Non-destroyed epidermal cell

p; Half-destroyed parenchymatous cell

f; Filamentous cells residue

d; Perfectly destroyed space

（水産科学研究所業績 第165号）

アルギン稀薄溶液の膠質学的平衡に関する研究

第1報　アルギン酸ソーダ溶液の粘性挙動 *

加　藤　健　司
（海藻化学教室）

STUDIES ON COLLOIDAL EQUILIBRIUM IN DILUTED ALGIN SOLUTION

I. VISCOSITY BEHAVIOR OF SODIUM ALGINATE SOLUTION

Kenji KATO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

As yet few investigations have been made on the colloidal equilibrium in diluted algin solution, especially in very diluted condition. Therefore the author investigated the equilibrium of algin solution with various physicochemical methods being applied to clarifying the colloidal behavior of polyelectrolyte in aqueous solution.

In the present paper was reported the variation in viscosity of the solution with concentration of algin. The η_{sp}/C C curve was very characteristic as a polyelectrolyte, and gave the critical concentration in minimum value of η_{sp}/C, about 0.33 g/dl, where the colloidal state of algin molecule would be transformed from the sol to the gel.

On the other hand, the amount of hydrated water or the apparent volume of algin molecule in the solution were presumed in accordance with calculation following Einstein's formula from the value of intrinsic viscosity. According to the above presumption, an enormous amount of water would be hydrated with the algin molecule in the diluted solution. The viscosity behavior of algin solution would be influenced by the hydrated water.

I. 緒　　言

アルギンは天然産高分子電解質として最も典型的なもので、その水溶液の膠質学的性質については高橋[1]、遠藤[2]及び清山[3]らの研究が行われているが、未だ多くの解決すべき問題を残して居り、殊に極めて低濃度の溶液に関する研究はその数も極めて尠い。

アルギンの稀薄溶液に於ては、その濃度により分子の形状や電離性を異にする数段階の分散状態の存在が示唆されているが、それらの分散状態の濃度変化に対する平衡関係を中心とした膠質学的研究は未だ行われていない。而してこれらの膠質学的分散状態が相互に変移する特異的な濃度、即ち限界濃度（Critical Concentration）を吟味し、更にこの限界濃度附近におけるアルギンの膠質学的分散状態の転移の問題を中心として、アルギン稀薄溶液の膠質学的平衡関係を究明するために本研究を始めた。

Mc Bain[4]は石鹸溶液の膠質学的平衡関係の研究に当つて、膠質分子の挙動を明かにするために、21以上の相異る物理化学的測定法を試みたと述べているが、一般に高分子電解質溶液の平衡関係は極

* 昭和27年4月、日本水産学会大会（東京）にて発表。

めて複雑であるから、その研究に際しては一、二の測定法のみを以ては到底正確を期待することは困難である。茲において著者はアルギン稀薄溶液における膠質学的平衡関係を研究するに当つて、数多くの物理化学的測定法を併用し、これらの測定結果に基づき総合的検討を試みたが、第1報においてはこれら各種の測定法の実施に先立ち、アルギン酸ソーダ溶液の高分子電解質的特性の大要を知るために、その濃度変化に伴う溶液の粘性挙動を究明し、爾後の物理化学的研究に資した。

II. アルギン酸ソーダの抽出及び精製

試料たるアルギン酸ソーダの調製にあたつては、抽出濾過操作が容易で、しかも純良な高粘性アルギンを得ることが出来る鈴木法[5]を採用した。

北海道日高産一等検三石昆布 *Laminaria angustata Kjellm.* 500gに水7.5lを加えて30分間煮沸して、可溶性成分を除去した後、5%$CaCl_2$溶液7.5l中に原藻を浸漬し、更に30分間煮沸する。この際原藻に含まれている遊離型のアルギン酸の大部はCa-塩となり、またCa^{++}のため色素層も固定され爾後の抽出操作において色素層が崩壊溶出して、抽出したアルギンを着色させることを可及的防止し得る。$CaCl_2$処理した原藻は次に10%NaCl溶液7.5l中に移し、20分間煮沸すると、原藻は膨潤する。この時加熱を止め、50gのNa_2CO_3を溶液に添加して放置すると、含有されているアルギンはアルギン酸ソーダとして溶出して来る。この際原藻は予め$CaCl_2$処理を施してあるので、原藻の表皮及び色素層は固定されたまゝ剝離し、細胞内容物たるアルギンが溶出するため布濾することによつて、容易に表皮、色素層其他繊維質の残滓の大部を除去することが出来る。この布濾したアルギン液は極めて容易にパルプ層を通して濾過出来る。この濾液は清澄で、殆ど着色も少いが、更に活性炭を用いて精製すると完全に脱色される。以上の如く精製されたアルギン酸ソーダ溶液に塩酸を加えて、酸性とし塩酸濃度を1Nに保つときはアルギン酸が凝析して来る。これをガーゼで布濾し、50～55°Cの温湯を以て再三洗滌し、塩素反応の消失するまで行う。このアルギン酸は更に苛性ソーダ溶液で中和溶解した後、塩酸でアルギン酸を凝析させる操作を反覆して充分に精製してアルギン酸を作り、更に再蒸溜水で透析を行う。この精製アルギン酸を苛性ソーダ溶液で中和溶解し、等量以上のエタノール中に注加してアルギン酸ソーダのゲルを析出させ、これを絹布で布濾し、更にエタノール及びエーテルを以てそれぞれ洗滌した後、室温で風乾してエーテル及びアルコールを揮散せしめ、真空デシケーター中で減圧乾燥して、アルギン酸ソーダ18gを得た。このアルギンは純白色羽毛状で、水分12.35%を含む。実験に際しては、すべてアルギンを再蒸溜水に添加した後一昼夜或はそれ以上放置してアルギンの分散を完全にならしめたものを供試液とした。

III. アルギン酸ソーダ溶液の粘度の測定

アルギン酸ソーダ溶液の粘度の測定は、Ostwald粘度計を用い、25±0.01°Cの恒温槽内で行つた。また測定濃度の範囲は0.003～2.00g/dlであるが、粘度変化が大きいため毛細管内径の同一な粘度計を用いては正しい粘度を測定することが不可能なので、降下秒時が20～120秒の範囲において測定が行われる様に、毛細管内径を異にする数本の粘度計を適宜組合せて測定の精確を期した。なお、2g/dl以上の濃度においては、構造粘性の発達が著しく、Ostwald粘度計を以て粘度を測定することに問題があるので、測定は2g/dl以下について行つた。更に、Heen[6]がアルギンの分子量測定に用いた様に、アルギン溶液に等量の 4N NaOH 溶液を添加し、アルギン酸ソーダの解離を抑制し、聚群形成（Schwarmbildung）を阻碍したものについても、その粘度を測定した。この場合、アルギン分子は高分子電解質的特性を喪失して、恰も無極性絲状高分子の如く挙動する。

第1、2表は、それぞれ上述の二つの場合についての粘度の測定値を示したものであるが、粘度は比粘度 η_{sp} を濃度 C で除した η_{sp}/C(Reduced Viscosity) を以て表わしている。第1図及び第2図は、

Table 1
Viscosity of Na-alginate Solution

C(g/dl)	η_{sp}	η_{sp}/c
1.942$_6$	67.12$_9$	34.55
1.165$_8$	23.40$_4$	20.08
0.699$_4$	9.929	14.20
0.419$_6$	5.206	12.41
0.251$_8$	3.198	12.70
0.151$_1$	2.188	14.48
0.0906	1.555	17.15
0.0544	1.095	20.13
0.0326	0.777$_3$	23.81
0.0196	0.551$_2$	28.15
0.0118	0.364$_7$	31.17
0.0058	0.205$_4$	34.96
0.0029	0.098$_3$	33.45
0.0001	0.009$_9$	10.08

Fig. 1 Viscosity of Na-alginate Solution at 25°C

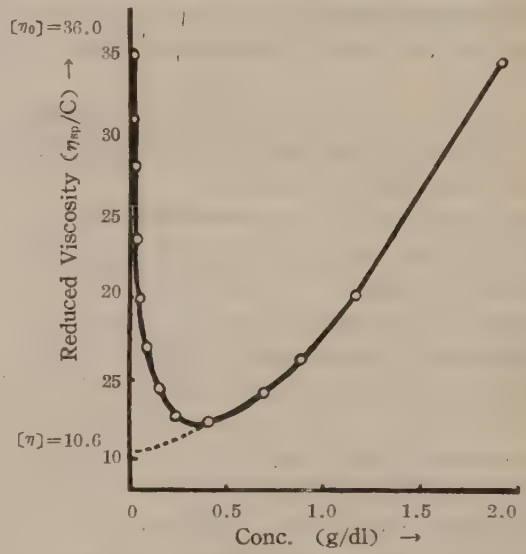
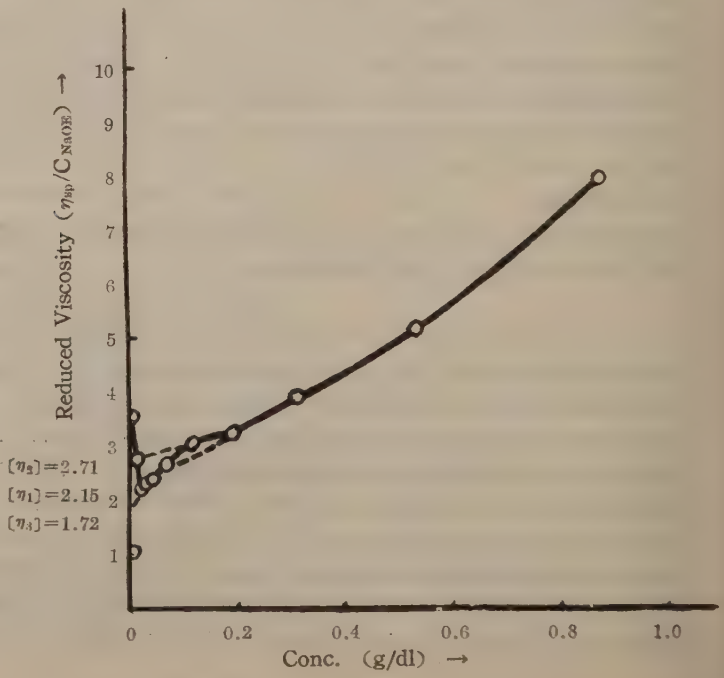


Fig. 2 Viscosity of Na-alginate in 2N NaOH Solution at 25°C

Table 2
Viscosity of Na-alginate in 2N NaOH Solution

C(g/dl)	η_{sp}	η_{sp}/c
0.880	7.049	8.010
0.528	2.742	5.193
0.317	1.256	3.962
0.190	0.623	3.279
0.114	0.346	3.034
0.068$_5$	0.187	2.728
0.041$_1$	0.095$_9$	2.393
0.024$_7$	0.057$_4$	2.323
0.014$_3$	0.032$_8$	2.216
0.0089	0.024$_6$	2.764
0.0045	0.016$_4$	3.644
0.0023	0.002$_5$	1.065



その η_{sp}/C の濃度変化を図示したものである。

IV. アルギン酸ソーダ水溶液の粘性挙動に関する二、三の考察

高分子物質の稀薄溶液においては、比粘度 η_{sp} は濃度の函数である。即ち

$$\eta_{sp} = f(C)$$

$$= a_0 + a_1C + a_2C^2 + a_3C^3 + \cdots\cdots \quad (1,1)$$

但し C は溶液の濃度、a_0、a_1、a_2、……はそれぞれ恒数である。

C = 0 のときは当然 $\eta_{sp} = 0$ となるから、従つて一般に $a_0 = 0$ である。

$$\therefore \quad \eta_{sp} = a_1C + a_2C^2 + a_3C^3 + \cdots\cdots \quad (1,2)$$

而して溶液の濃度が充分低いときは第2項以下は無視出来るから

$$\eta_{sp} = a_1C \qquad \therefore \quad \eta_{sp}/C \fallingdotseq a_1 \quad (1,3)$$

となり、従つて

$$[\eta_{sp}/C]_{C\to 0} = a_1 = [\eta] \quad (1,4)$$

となる。この $[\eta]$ は極限粘度（Intrinsic Viscosity）と呼ばれ、濃度に関係なく一定の値を示すべきである。依つて η_{sp}/C は一般に下式の如き濃度の函数として与えられ、η_{sp}/C-C曲線はよく溶液の濃度変化に伴う溶液の粘性挙動を示す。

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2C + \cdots\cdots \quad (1,5)$$

而してその膠質溶液の恒数たる $[\eta]$ は膠質分子の大さ（分子量）、或はその分子形状を反映して居り、Einstein は球状粒子に対して次の如き粘度則を与えている。

$$[\eta] = KZ \text{（但し、Zは質員数、Kは恒数）} \quad (2,1)$$

更に絲状分子に対して桜田[7]は次の修正式を与えたが、α は分子形状に関係する恒数である。

$$[\eta] = KZ^{\alpha}$$

玆においてアルギン溶液の濃度変化に伴う膠質分子の状態の変移を類推するため、第1、2図において、それぞれ η_{sp}/C 曲線を C=0 に外挿して $[\eta]$ を求めた。

第1図において粘性曲線は0.3g/dl附近に極小点を有する懸垂曲線をなしているので、C→0 に外挿するに際し多少困難を伴うが、一応図の如く $[\eta]$=10.6、及び $[\eta_0]$=36.0 を得たが、普通には前者が用いられている。今 η_{sp}/Cの極小値濃度0.33g/dl以下はStaudingerの所謂ゾル溶液領域と称せられる部分で、アルギンの分子形状はその電離性を大きく反映し、絲状分子においては η_{sp}/C 値は分子の見掛上の長さの函数と考えられ、濃度の増加に伴う η_{sp}/C の減少はアルギン絲状分子の屈撓性の発達に伴う分子の比容積の縮小を意味し極稀薄溶液において棒状に延伸していたアルギン分子が屈撓し、絲毬（Randum Coil）に移行して行くことを示すものと考えられる。また2N NaOH 溶液中においてはアルギンの電離性が強電解質たるNaOHの存在により抑制されるため聚群形成は破壊され、恰も無極性絲状分子の如く挙動する。第2図において、η_{sp}/C は濃度の増加に伴い一般の無極性絲状分子に見られる如く直線的に減少するが、極稀薄溶液部に於ては、その挙動は必ずしも単純ではなく、その膠質学的平衡の複雑性を示唆している。アルギン稀薄溶液の $\eta_{sp}/C_{2N\ NaOH}$ 曲線はこれを次の三段階に分けて考えることが出来る。即ち割合高濃度部より第1図の限界濃度（0.3g/dl）附近までの直線的に変化する部分、限界濃度より0.1g/dl前後までの割合平坦で粘性変化の緩慢な個所、及びそれ以下の粘性の大きく変化する部分とに分けられる。かゝる $\eta_{sp}/C_{2N\ NaOH}$ の変化は第2図の場合に限らず、著者が今まで試みた多数の実験例によつても確認されたものであつて、殊に極稀薄部の粘度変化は極めて

注目すべきものがある。但し第2図における0.0045g/dlの極稀薄部における小さな極大値の存在は、多数の測定を試みたが、出現する場合としからざる場合とがあるので、常にかゝる現象が起るとは断じ難い。この問題の詳細については別に検討されねばならないと思われるので、上述の如く三段階に粘度挙動を区分して考察することにした。而してこれら3段階の粘性曲線について、それぞれ C→0 を外挿して〔η〕を求めた。即ち、第1段階（＞2.0～0.2g/dl）の外挿値 $〔\eta_1〕_{NaOH}=2.15$、第2段階（0.2～0.1g/dl）$〔\eta_2〕_{NaOH}=2.71$、第3段階（0.1g/dl以下）$〔\eta_3〕_{NaOH}=1.72$ を得る。従つて〔η〕より Einstein の粘度則に基づき鎖員数（重合度）を算出する場合にいづれの値によるべきかは大いに問題がある。第2図の場合一般に常用されている Heen の方法により、アルギン酸ソーダの重合度を算出すると、その〔η〕の相違から114～181の範囲となる。以上の観点からもアルギンの極稀薄溶液における膠質学的平衡の詳細な検討の必要性が生ずる訳である。

次に粘性曲線より濃度変化によるアルギン分子の拡り（見掛けの比容積、作用範囲 Wirkungsbreich）の変化について考察する。Einstein は球形分子について〔η〕と粒子の比容積の間に次式を与えている。

$$〔\eta〕 = 0.025V \qquad (3,1)$$

但し、V は球形粒子の比容積（作用範囲）である。

しかるに溶液中の絲状分子の作用範囲は球形粒子の場合と異り、溶存する分子の固有容積に等しくなく、分子の見掛上の長さの函数である。また、もしその膠質粒子が溶媒和している場合は、その溶媒和層を含む見掛け上の容積、即ち分子が溶媒と作用を及ぼし合つている範囲を意味すると考えられる。而して第1図における限界濃度 0.3g/dl 附近においては、η_{sp}/C は極小となり、その作用範囲もこれに伴い最小となつていると想像されるが、これは第2報においても推論されているところである。而してこの濃度に於ては最も固く緊つたアルギン分子の絲毬が最密充塡し、粒子相互の分子運動を拘束し合つてゲル構造に転移せんとしている状態にあると考えられるので、当然その場合アルギンの絲毬は恰も完全な球状粒子の如き外観を呈しているのと推定してよいであろう。そしてその球状粒子はアルギン分子に結合した多数の水和水を含む作用球である。茲においてこのゲル化の限界濃度（0.3g/dl）における $\eta_{sp}/C=12.2$ より(3.1)式により V を計算するとアルギン 1g は多量の水と結合してその絲毬粒子の見掛け上の容積は約 490cc/g となつている。

またゲル化の限界濃度においては理論的にも、水和層を被つているアルギン絲毬粒子が最密充塡しそれら粒子の容積の総和が丁度溶液全体の容積と等しくなつている筈である。いまかゝる状態にある理論的限界濃度を C_c とすると C_c は(3.1)式より次の如くして求めることが出来る。

$$C_c = 1/V \times 100 = 0.025/〔\eta〕\times 100 \qquad (3.2)$$

而して仮に〔η〕=1.22として C_c を計算すれば $C_c \fallingdotseq 0.2$(g/dl)となり、第2図における限界濃度0.33g/dl と略一致する。しかるに $C_c=0.2$ なる値は第2図の η_{sp}/C_{NaOH} 曲線の第1段階の発端濃度0.2g/dl と全く一致することは極めて興味深く、粘性曲線の極小値濃度よりも幾分低濃度の理論的限界濃度こそ、真に溶液がゾル構造からゲル構造へ転移する限界濃度で、ゲル溶液領域の発端をなすものと考えられる。かゝる理論的限界濃度附近における膠質学的特異性については更に第2報以下において更に指摘するつもりである。

次に $〔\eta〕_{NaOH}$ より 2NNaOH 溶液においてもなおアルギン分子より脱離されない結合力の強い水和水量を概算して見る。いま一般に $〔\eta〕_{NaOH}$ として常用される第1段階における極限粘度 $〔\eta_1〕_{NaOH}=2.15$ より、(3.1)式によりアルギンの見掛け上の比容積を計算すると V=84cc/g となり、ウロン酸ソーダ単量体 1mol 当り924分子の水が結合していることになる。第2報において測定したアルギン酸ソーダ（固体）の比容積 0.612 を基礎として計算すると、アルギン分子は水和して、その見掛け上の容積は

約140倍に膨潤していることになる。更に NaOH を含まないアルギン溶液における〔η〕=10.6 と、〔η〕$_{NaOH}$=2.15 とを比較するとき、アルギン酸ソーダが稀薄溶液において聚群を形成している場合は NaOH で聚群を破壊した場合の約5倍の水をアルギン分子の周囲に保有していることになる。従つてアルギン稀薄溶液、特にゾル溶液領域における膠質学的平衡の推移、殊に粘性挙動はこの聚群に保有されている水分子により当然強く影響を受けるであろう。

V. 総　　括

アルギン酸ソーダ稀薄溶液について2N NaOH の存在する場合と、しからざる場合とについてその粘度を測定し、それらの粘性曲線（η_{sp}/C−C）より極限粘度〔η〕及びゲル化の限界濃度を求め、それらよりアルギン分子の拡りや水和量の変移について推論し、溶液の粘性挙動において水和量の変移が大きく反映することを述べた。更に理論的ゲル化限界濃度（C_c）を算出し、実測値と略一致するが、実測限界濃度よりも幾分稀薄部に偏していることに注目し、このC_cが実験的にも極めて興味ある膠質学的転移濃度を与えるであろうことを示唆した。

終りに臨み、本実験に際し終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜つた鈴木昇教授に深謝する。

引　用　文　献

（1） 高橋：「海藻工業」（1946）東京
（2） 遠藤：日化、72,（1952）, 968.
（3） 清山：工化、52－54（1951～53）、第1～11報
（4） Mc Bain, J. W：“Frontiers in Colloid Chemistry”,（1950）113—116.
（5） 鈴木：本報、4、（1953）, 69.
（6） Heen, von E：Kolloid Ztschr. 83（1938）, 204.
（7） 桜田：化繊講演集、5（1940）, 33.

（水産科学研究所業績 第166号）

アルギン稀薄溶液の膠質学的平衡に関する研究

第2報　アルギン酸ソーダ溶液の容積収縮について *

加　藤　健　司
（海藻化学教室）

STUDIES ON COLLOIDAL EQUILIBRIUM IN DILUTED ALGIN SOLUTION

II. VOLUME CONSTRICTION OF SODIUM ALGINATE SOLUTION

Kenji KATO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

In the present paper, the volume constriction of diluted algin solution being due to hydration of the algin molecule was determined in different concentrations of the solution.

The volume constrictions were 26～30 cc in the gel state and 50～60 cc or over in the sol, owing to the presence of a molecule of Na-uronate monomer which polymerized into the algin molecule.

Provided that the volume constriction was due to the hydration of algin by co-ordinate bond, the number of water molecules co ordinated in the uronate monomer would be 6～16, which should agree with the co-ordinated number of water molecules calculated in conformity with Sponsler's report[4].

The hydrated water by co ordinate bond would only occupy 1.6% of the total hydrated water which exerted distinct influence upon the viscosity of the diluted solution.

I. 緒　　言

第1報[1]においてアルギン分子が極めて多量の水分子を周囲に保有し、その水分子がアルギン溶液の膠質学的挙動に重要な役割を果していることを示唆した。

一般に電解質溶液においてイオンと水分子との間に結合が起ると、それに伴い溶液の物理化学的性質にも変化が現われる。このイオンの水和に伴う溶液の物理化学的変化としては、溶質と水との引力（水和の強さ）による溶液の内部圧の増加、水和による自由水分子の減少又は脱水、水和による溶質粒子の見掛けの大さ（水和容積）の増加などを挙げることが出来るが、溶液の内部圧の増加は必然的に溶液の容積収縮となつて現われる。これはイオンと水分子の双極子との間に作用する靜電引力に基因する溶液の圧縮によるもので、Nernst及びDrude[2]はかゝる現象をElectrostriction効果と称しているが、これは次式にて示される。

$$\Delta V = V_1 + V_2 - V_3 \qquad (1)$$

こゝにV_1は溶媒容積、V_2は溶質容積、V_3は溶液容積、ΔVは容積収縮を示す。

アルギン溶液の容積収縮に関しては清山[3]の報告があるが、これも高濃度における測定に重点をおいているので、稀薄溶液については詳細な測定が行われていない。

---

* 昭和26年6月、日本水産学会北海道支部春季例会（札幌）（予報）、及び昭和27年4月、日本水産学会大会（東京）にて発表。

茲において著者はアルギン酸ソーダ稀薄溶液の容積収縮 ΔV を(1)式により求め、ΔV を溶液濃度（ウロン酸ソーダ単量体当りのモル濃度）で除して、単量体1モルの水和による容積収縮率 $\overline{V}_2$ を計算した，但しこの容積収縮は系内の結合水分子のみにおいてのみ起り、アルギンポリイオン自体の容積は溶液中で変化しないものとして計算した。

II. 実　　験

第1報に用いたと同一のアルギン酸ソーダを試料とし、再蒸溜水に添加後一昼夜或はそれ以上放置して分散を完全ならしめたものを供試液とした。

アルギン溶液の容積収縮の測定に当つては、各濃度について Weld 型比重瓶4個を用い、その溶液の密度を測定し、その平均値より容積変化を算出した。先づ供試液を比重瓶に充たし、25±0.01°Cの恒温槽中に浸す。約20分間で内容液の温度が恒温槽の温度に一致するので、枠上に溢れ出た液を手早く濾紙で拭い、瓶を取出しアセトンに浸し、周囲の水をよく乾かして後秤量した。固体アルギンの密度測定は、少量の試料を比重瓶に入れ、媒体液としてベンゾールを充して間接に密度を知る置換法によつたが、アルギン酸ソーダ（固体）の比容として0.612cc/g なる値を得た。なお、上述の如くして

Table 1　Volume Constriction of Na-Alginate Solution

C(g/dl)	Mol Conc. (per monomer)	Specific Volume V(cc/g)	ΔV (cc) (per litre Solution)	Volume Constriction $\overline{V}$ (cc/monomer)	Calc. Hydrated Water (d=1.3) (Mol No. of H_2O/monomer)
1.959	0.1002	0.9924_3	2.92	29.7_3	7.1
0.992_4	0.0501_3	0.9977_6	1.30_5	26.2_0	6.3
0.497_3	0.0251_3	0.9998_3	1.17	46.5_6	11.3
0.244_7	0.0123_4	1.0013_6	0.62	50.2_4	12.2
0.100_2	0.0050_6	1.0023_9	0.31	62.0_0	15.0

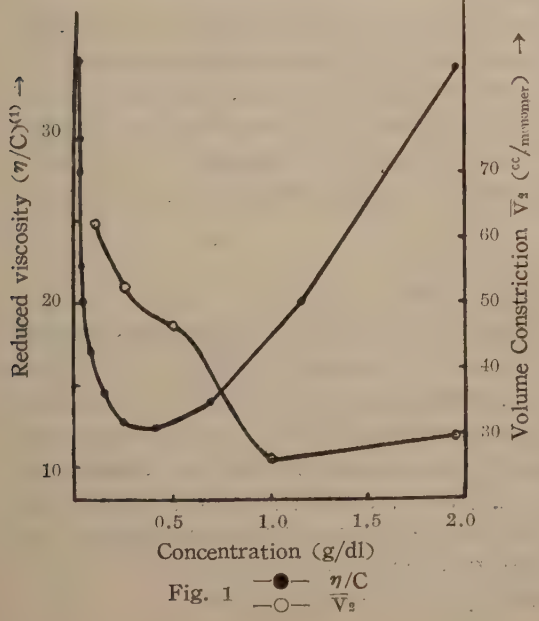


Fig. 1　—●— η/C　—○— $\overline{V}_2$

測定したアルギン酸ソーダ溶液の密度より算出した溶液の容積収縮は第1表及び第1図に掲げたが、0.1g/dl以下の低濃度においては測定の精確を期することが不可能であつたので省略した。本報においては比較的精確に測定出来る0.1～2.0g/dlの範囲の溶液について、その容積収縮を示した。表中 ΔV は溶液1000cc に対する容積収縮(cc)で $\overline{V}_2$ は単量体1モル当りの容積収縮である。

III. アルギン酸ソーダ溶液の容積収縮より見たアルギン分子の水和

第1図によればアルギン酸ソーダ溶液の1g/dl以上の所謂ゲル溶液領域においては容積収縮が26～30cc/monomer で顕著な変化はなく濃度の増加に伴い僅かに増大する傾向を示す。これは濃度増加に伴う水和の進行が緩慢であることを示すものであるから粘性の著増はアルギンの水和容積の増大に

依るものではなく、むしろゲルの網状構造の発展に伴う構造粘性効果に帰すべきものである。しかるに0.5g/dl以下の低濃度領域においては、濃度の減少に従い容積収縮率が増大し水和現象の進捗が見られ第1報の粘性挙動と全く符合する。これは稀釈に伴いアルギン分子の絲毬構造が軟化伸張し、親水性の解離基の実効数が増大したためと考えられる。この場合0.3～0.4g/dl附近で曲線が幾分遅滞して小さなステップ状をなしているのが注目されるが、これはこのゲル化の限界濃度でアルギン分子の絲毬が最も緊縮しゲル構造へ転ずる中間過程にあるためと思われ、容積収縮現象から見れば真のゲル構造は粘性の限界濃度よりむしろ高濃度に偏し第1報の場合とは異つているが、これらの関係については後報に譲る。

また C. Nogarada[4]によれば、化学的結合の水の密度は1.7、水和及び配合の水は1.3、吸着水は1.0となつているが、清山[3]はアルギン酸ソーダの場合はむしろ化学的結合水に近いと述べている。これはその測定が主として高濃度のゲル領域で計算したもので、稀薄溶液の場合はこれと同様であるとは限らない。いま稀薄溶液における結合水が主として配位結合によりアルギン分子と結合しているものと仮定して、各濃度における容積収縮率から単量体1モルに結合している水和配位数を計算すると、ゲル溶液領域では6～7分子の水を、限界濃度附近では10分子程度の水分子が結合して居り、また限界濃度以下のゾル溶液領域では12～15分子以上の水分子が結合していることになる。

而してSponsler[5]らによつてゲラチンについて算定した親水基の水分子配位数を参考にしてアルギン酸ソーダの単量体たるウロン酸ソーダについて計算して見る。ウロン酸ソーダの親水基としては、2.5 OH と 1-COO Na があるが、-OHは3分子の水を配位し、また-COO Na は解離するので Na^+ と $-COO^-$ とに水和するものとすると Na^+ の水分子配位数は4.7[7]、COO^- は4であるから、ウロン酸ソーダ単量体には16.2分子の水が配位することになり実測値を C→0 に外挿した $\overline{V}=69cc$ より計算した配位数16.6とよく一致し、ゾル領域では絲毬が緩く伸張しその親水基が解放され、その親水基の殆どすべてに水分子が完全に配位しているものと想像される。

また前報で溶液の粘性挙動に影響を与える水和量が単量体1モルに対して約924モルであると推定したが、Electrostriction効果により溶液に容積収縮を起させるような配位結合の水は約1.6%にすぎずElectrostriction 効果の顕著でない吸着水（密度 1.0）が圧倒的に多いことが判る。従つてアルギン分子と水和している水分子の大半を占める吸着水は、その結合が Van der Waals' force であるために比較的弱く、外囲からの影響を鋭敏に反映しアルギン溶液の粘性挙動を複雑にしている。従つてアルギン酸ソーダ稀薄溶液の粘度が熱や少量の電解質添加は勿論機械的刺戟によつてさえも減少する事実がよく肯かれる。

Ⅳ. 総　　括

アルギン酸ソーダ稀薄溶液の密度を測定し、これよりアルギンの水和に伴う溶液の容積収縮を計算し、濃度変化に伴う水和の推移を考察した。即ちアルギンの単量体たるウロン酸ソーダ1モル当りの容積収縮はゲル領域では26～30 cc、ゾル領域では50～60 cc以上であつた。この容積収縮が配位結合による水和によるものとして単量体1モルに配位する水分子数を計算すると6～16で、Sponslerの報告に基き計算したウロン酸ソーダ単量体の親水基に対する水分子配位数と略一致することを確め、ゾル領域におけるアルギンの水和が配位結合に依ることを推論し、この配位結合による水和水は粘性挙動に影響を与える水和水の約1.6%にすぎず、従つてアルギン溶液が熱や化学物質の添加は勿論、機械的な刺戟によつてさえ容易に粘度を変化させる理由が肯かれる。

終りに、本実験に際し終始懇切な御指導と御鞭撻を賜つた鈴木昇教授に深謝する。

引 用 文 献

(1) 加藤：本誌，4 (1953)，76

(2) Nernst & Drude : Z. f. Phys. Chem., 15 (1894), 79 (佐々木：科学 17 (1949), 48 より引用)

(3) 清山：工化，53 (1951)，73

(4) Nogarada, C : Chem. Abst., 26 (1932), 1869.

(5) Sponsler, O. L., Bath, J. D. and Ellis, J. W : J. phys. Chem., 44 (1940), 996.

(6) 鈴木：本誌，4 (1953)，69.

(7) 安永，佐々木：日化，72 (1951)，28.

(水産科学研究所業績 第167号)

海藻に関する化学的研究

第7報　各種海藻中のチロシン及びトリプトファン含量に就て

高　木　光　造　(水産食品化学教室)

CHEMICAL STUDIES ON MARINE ALGAE
Ⅶ. TYROSINE AND TRYPTOPHANE CONTENTS IN VARIOUS SPECIES OF MARINE ALGAE

Mitsuzo TAKAGI

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

Tyrosine and tryptophane in various species of marine algae were determined by O. Folin & A. D. Marenzi's method.

The results obtained are summarized as in Table 1.

1. The proportion of tyrosine content to crude protein was estimated as from 0.95 to 1.74% in green algae, 1.58 to 5.70% in brown algae, and 1.48 to 4.75% in red algae. The proteins of brown and red algae may be considered to be as rich as other plant or animal proteins regarding this amino acid. The percentage contents of tyrosine to crude protein in the case of green algae, however, is less than that of brown and red algae.

2. The proportion of tryptophane content to crude protein was estimated as from 0.41 to 2.50% in green algae, 0.94 to 8.75% in brown algae, and 0.54 to 2.35% in red algae. Among those marine algae, the difference of tryptophane content can not be recognized.

3. The variations of the contents of those amino acids in the stage of growth of *Laminaria japonica* were investigated. It is considered from the results that tyrosine content decreased gradually with growth, while, tryptophane content increased.

1　緒　　言

チロシン及びトリプトファンは所謂環状アミノ酸として栄養上不可欠の要素であり，生体内において種々の重要な生理作用を有することは言を俟たないところであるが，これらアミノ酸の海藻中における含量については A. Mazur & H. T. Clarke[1]が *Ulva lactuca*, *Laminaria*, *Sargassum* 及び *Chondrus crispus* について興味ある結果を報告している。即ち緑藻 *Ulva* はトリプトファンを含むがチロシンを全く含まず，褐藻 *Laminaria*, *Sargassum* 及び紅藻 *Chondrus* はチロシン及びトリプトファンを共有すると述べている，

著者[2]は前に二，三の緑藻について二次元のペーパー・クロマトグラフ法により定性的に構成アミノ酸を検した際，チロシンに基く spot の存在を認めなかつたが皆無であると速断しえないことを附言した。従つて緑藻中にはチロシンが皆無であるか，又は含有されているとしてもきわめて僅かであることは疑いなき事実である。

著者は O. Folin & A. D. Marenzi[3] 法により海藻中のチロシン及びトリプトファンの定量を行つ

て，以上の疑点を明らかにすると共に，海藻の栄養価値評価の一資料とすることは海藻を食料品として広範囲に利用しているわが国情から強ち無駄ではないと考え，本研究を行つた。而してこゝに興味ある結果をえたので報告するものである。

2　実験試料並びに実験方法

〔1〕 実験試料……函館近郊の沿岸で採取したきわめて新鮮な試料を再三水洗した後風乾したもの及び市販品（乾物）を更に 100°C の乾燥器中で30分加温乾燥して粉末とし実験に供した。

〔2〕 測定方法

50cc 容三角フラスコに試料約 1g をとり，これに 10% $Ba(OH)_2$ 20cc を加え，錫箔を巻いたコルク栓に約 50cm のガラス管を附し，沸騰湯浴中で約7.5時間加水分解する。こゝにえられた溫加水分解液に 7N H_2SO_4 3cc を加え，これを遠心分離して上澄液を 50cc 容のメスフラスコに注ぎ，沈澱物を再び水で洗滌し遠心分離して上澄液を前記メスフラスコに加え全量を 50cc とし，次いで 2～3g の Kaolin を加え，よく振盪した後遠心分離する。尙脫色不充分のときはこの操作を繰返し，次いでこれを濾過して Kaolin を完全に除き濾液 40cc を実験に供した。

A　チロシン

供試液 40cc を 50cc 容沈澱管にとり，15% $HgSO_4$ を含む 6N H_2SO_4 4cc を滴下し，2～3時間放置してトリプトファンを完全に沈澱させる。次いでこれを遠心分離してチロシンとトリプトファンとを分別し，上澄液を 100cc 容メスフラスコに注ぎ，沈澱を 1.5% $HgSO_4$ を含む 2N H_2SO_4 12cc で洗い，10分放置後遠心分離して上澄液を前記メスフラスコ中に移す。更に沈澱を 0.1N H_2SO_4 12cc で洗い，再び遠心分離して上澄液を前記メスフラスコに移し，これに 7N H_2SO_4 6cc を加え沸騰湯浴中に 5 分加熱した後冷却，2% $NaNO_2$ 1cc を加え，2 分後 100cc に稀釈混和して30分以内に比色を行う。又別に 1cc 中 1mg のチロシンを含む標準溶液について同様の発色を行い，チロシンの標準溶液を 20mm に固定して比色を行つた（チロシンの比色に当つて注意すべきは溶液の酸度で，これは常に同一でなければならない。酸度の最大許容誤差は10%である）。

然るときは供試液中のチロシンの量（C）は次式によつて求められる。

$$C = \frac{C_1 h_1}{h}$$

但し，C_1……標準溶液中のチロシンの量（mg），h_1……標準溶液の読み（20mm），

h……供試液の読み（mm）

B　トリプトファン

トリプトファンの水銀化合物を破壊するため沈澱管中の沈澱に 1N HCl 10cc を加え，沸騰湯浴中で30分加熱する。この際フエノール試薬により呈色しない微量の不溶性物質を濾過して除き，100cc 容メスフラスコ中に全容を約 60cc とする。次いでこれに Sat. Na_2CO_3 25cc を加えて混合し，更にフエノール試薬 5cc を加えて再び混合し30分放置する。然る後これに 5% NaCN 2～3cc を加え 100cc に稀釈して混合し標準溶液と比色する。標準溶液は前記チロシン標準溶液 1cc を 100cc 容メスフラスコにとり，約60cc に稀釈して前記同様処理して呈色させた。比色並びに計算方法はチロシンの場合と同様であるが，これに factor 0.84 を乗じトリプトファン量を求める。

著者は別に個々の試料について窒素を測定し，その値に係数を乘じて粗蛋白量を算出し，粗蛋白に対するチロシン及びトリプトファン含量を求めて比較し，海藻蛋白の特性の一端を伺うことにした。

Fig. 1 Graphs showing the Amount of Tyrosine and Tryptophane Contents to Crude Protein in Various Species of Marine Algae

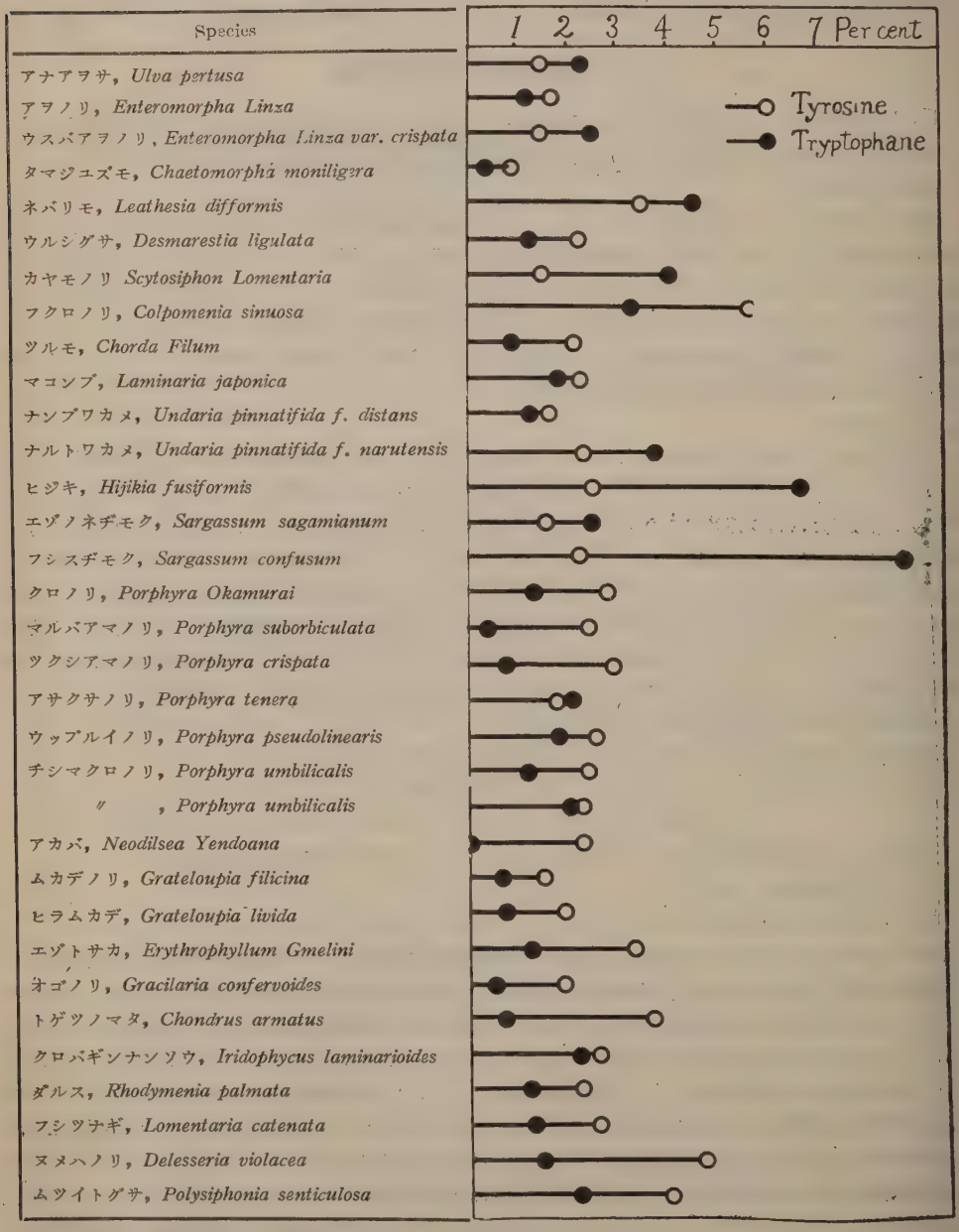


Table 1 Tyrosine and Tryptophane Contents in Various Species of Marine Algae

	No.	Species	Plate of sampling	Date of sampling	Tyrosine in dry matter %	Trypto-phane in dry matter %	Crude protein %	Tyrosine in crude protein %	Trypto-phane in crude protein %
Green algae	1	アナアヲサ, *Ulva pertusa*	Nanaehama	Mar. 9	0.526	0.838	36.26	1.45	2.31
	2	アヲノリ, *Enteromorpha Linza*	〃	Mar. 9	0.553	0.399	31.69	1.75	1.26
	3	ウスバアヲノリ, *Enteromorpha Linza var. crispata*	〃	May 2	0.250	0.449	17.91	1.40	2.51
	4	タマジユズモ, *Chaetomorpha moniligera*	〃	June 25	0.176	0.076	18.36	0.96	0.41
Brown algae	5	ネバリモ, *Leathesia difformis*	Moheji	June 14	0.194	0.256	5.52	3.51	4.64
	6	ウルシグサ, *Desmarestia ligulata*	Nanaehama	May 2	0.483	0.293	21.30	2.27	1.38
	7	カヤモノリ, *Scytosiphon Lomentaria*	〃	May 2	0.295	0.763	18.64	1.58	4.09
	8	フクロノリ, *Colpomenia sinuosa*	〃	May 2	0.559	0.329	9.80	5.70	3.36
	9	ツルモ, *Chorda Filum*	Moheji	June 14	0.226	0.097	10.35	2.18	0.94
	10	マコンブ, *Laminaria japonica*	Nanaehama	Apr. 25	0.224	0.190	9.96	2.25	1.91
	11	ナンブワカメ, *Undaria pinnatifida f. distans*	〃	Apr. 28	0.391	0.303	22.84	1.71	1.33
	12	ナルトワカメ, *Undaria pinnatifida f. narutensis*	——	——	0.232	0.380	9.93	2.34	3.83
	13	ヒジキ, *Hijikia fusiformis*	Moheji	June 14	0.112	0.288	4.32	2.59	6.67
	14	エゾノネヂモク, *Sargassum sagamianum*	Nanaehama	June 14	0.337	0.632	23.49	1.65	2.69
	15	フシスヂモク, *Sargassum confusum*	Moheji	June 14	0.153	0.604	6.90	2.22	8.75
Red algae	16	クロノリ, *Porphyra Okamurai*	Isikawa	Feb. 10	0.964	0.420	33.43	2.88	1.26
	17	マルバアマノリ, *Porphyra suborbiculata*	Wakayama	Mar. 1	0.775	0.192	35.27	2.20	0.54
	18	ツクシアマノリ, *Porphyra crispata*	Kumamoto	Feb. 20	1.028	0.339	34.11	3.01	0.99
	19	アサクサノリ, *Porphyra tenera*	Ise	——	0.662	0.772	35.21	1.88	2.19
	20	ウップルイノリ, *Porphyra pseudolinearis*	Oshoro	——	0.758	0.529	27.94	2.71	1.89
	21	チシマクロノリ, *Porphyra umbilicalis*	Abashiri	——	0.837	0.406	34.22	2.45	1.19
	22	〃 , *Porphyra umbilicalis*	Nemuro	——	0.704	0.672	31.38	2.24	2.14
	23	アカバ, *Neodilsea Yendoana*	Moheji	June 14	0.214	trace	9.52	2.28	trace
	24	ムカデノリ, *Grateloupia filicina*	Nanaehama	Feb. 1	0.397	0.218	26.75	1.48	0.81
	25	ヒラムカデ, *Grateloupia livida*	〃	Feb. 1	0.633	0.309	31.25	2.03	0.99
	26	エゾトサカ, *Erythrophyllum Gmelini*	〃	Feb. 1	0.953	0.346	25.87	3.68	1.34
	27	オゴノリ, *Gracilaria confervoides*	Moheji	June 14	0.245	0.069	11.96	2.05	0.58
	28	トゲツノマタ, *Chondrus armatus*	Nanaehama	Feb. 1	0.877	0.180	22.17	3.96	0.81
	29	クロバギンナンソウ, *Iridophycus laminarioides*	〃	Apr. 24	0.518	0.443	18.81	2.75	2.36
	30	ダルス, *Rhodymenia palmata*	〃	Apr. 24	0.477	0.253	21.38	2.23	1.21
	31	フシツナギ, *Lomentaria catenata*	〃	Feb. 1	0.513	0.249	19.59	2.62	1.27
	32	ヌメハノリ, *Delesseria violacea*	〃	May 2	1.202	0.365	25.27	4.76	1.44
	33	ムツイトグサ, *Polysiphonia senticulosa*	〃	May 2	1.168	0.618	28.78	4.06	2.15

3 実験結果並びに考察

〔1〕 各種海藻中のチロシン及びトリプトファン含量に就て

以上の測定法に従い各種海藻中のチロシン及びトリプトファンの定量を行つてえた結果は Table 1 に示す如くで，Fig. 1 はこれを図示したものである。いうまでもなく同一の種類についても採取時期或いは採取場所によつてその含量に著しい差異を示すことは従来多くの研究者[4],[5]によつて指摘されているので本実験においてはその条件を明示した。従つてこゝにえた実験結果はその条件に制拘された一つの分析値を表わすに過ぎなく，これを以て一般的に海藻の栄養価値を断定することは多少疑問であるが，一応こゝにえた数字に基いて論究してみたい。

以上より乾物中のチロシン及びトリプトファン含量について見るに，チロシンは0.112～1.202%，トリプトファンは0.069～0.838%にあつたが，アカバにおいてはトリプトファンは痕跡に過ぎなかつた。かくの如く種類によりチロシン及びトリプトファン含量には著しい差異が認められたが，海藻の種類により窒素含量も亦著しく異なるから，粗蛋白に対するチロシン及びトリプトファン含量を比較した方が海藻の栄養価値並びに蛋白の特性を明らかにするために妥当と考えられる。依つて粗蛋白に対するチロシン及びトリプトファン含量について見ると，チロシンは緑藻においては0.95～1.74%，褐藻においては1.58～5.70%，紅藻においては1.48～4.75%にあつて，緑藻中のチロシン含量は褐藻及び紅藻に比し著しく少いことが解る。然しながら A. Mazur & H. T. Clark が指摘した如く緑藻中にチロシンが皆無であるとの断定には賛同しえない。

而して褐藻，紅藻蛋白中のチロシン含量は大豆蛋白グリシニンのような植物蛋白，或いは獣肉，魚介肉等の動物蛋白中のチロシン含量にほゞ匹敵することが解る。然しながら褐藻，紅藻中のあるものにチロシン，トリプトファン以外の環状化合物の存在が指摘[6],[7],[8]されているので，以上の分析値を以て悉くチロシン含量となしえないけれども一応海藻蛋白の特性をうかがう一つの目安となるであろう。

一方トリプトファンは緑藻においては0.41～2.50%，褐藻においては0.94～8.75%，紅藻においては0.54～2.35%にあつて，緑藻，褐藻，紅藻と区別して一般的にその多寡は論じられないが，褐藻類中カヤモノリ，ヒジキ，フシスヂモク等において粗蛋白に対するトリプトファン含量の著しく多かつたのはトリプトファン以外に呈色に与る環状化合物の存在も容易に推定されるのであり，この点については再検討する必要があろう。

〔2〕 マコンブ，*Laminaria japonica* の生長過程におけるチロシン，トリプトファン含量の変化

海藻の粗蛋白量は採取時期により著しく異なることは従来多くの研究者によつて指摘され，著者も亦前報[9]においてウップルイノリの窒素形態が季節的に著しく変動することを認めたが，マコンブの採取時期によるチロシン及びトリプトファン含量の変化を実験するに当つて，同一時期においても環境条件の相違により，又個体相互間における発生の遅速により生長発育の度合に著しい差異を認めたので，分析試料調製に当つて，体長及び体巾によつて分けた方が適当と思われたのでそれに従うことにした。以上の注意のもとに実験を行つてえた結果は Table 2 の如くで，Fig. 2 はこれを図示したものである。

Table 2 Variations of Tyrosine and Tryptophane Contents in the Stage of Growth of *Laminaria japonica*

No.	Date of sampling	Body length cm	Body width cm	Tyrosine in dry matter %	Tryptophane in dry matter %	Crude protein %	Tyrosine in crude protein %	Tryptophane in crude protein %
1	Apr. 26	1 — 15	1.5	0.325	0.139	19.61	1.66	0.71
2	〃	15 — 35	2	0.273	0.146	19.58	1.39	0.74
3	〃	35 — 50	3	0.266	0.149	19.41	1.37	0.76
4	〃	50 — 70	5	0.264	0.143	18.85	1.39	0.76
5	May 27	70 — 80	5	0.253	0.154	18.34	1.38	0.84
6	〃	80 — 90	6	0.261	0.163	17.11	1.53	0.95
7	〃	90 — 100	8	0.246	0.196	16.42	1.50	1.19
8	June 4	100 — 110	9	0.216	0.137	16.27	1.33	0.84
9	〃	110 — 120	10	0.201	0.204	15.03	1.39	1.36
10	〃	120 — 130	10	0.246	0.277	15.00	1.46	1.85
11	〃	130 — 140	12	0.165	0.217	14.85	1.11	1.46
12	June 5	140 — 150	12	0.159	0.227	14.57	1.09	1.56

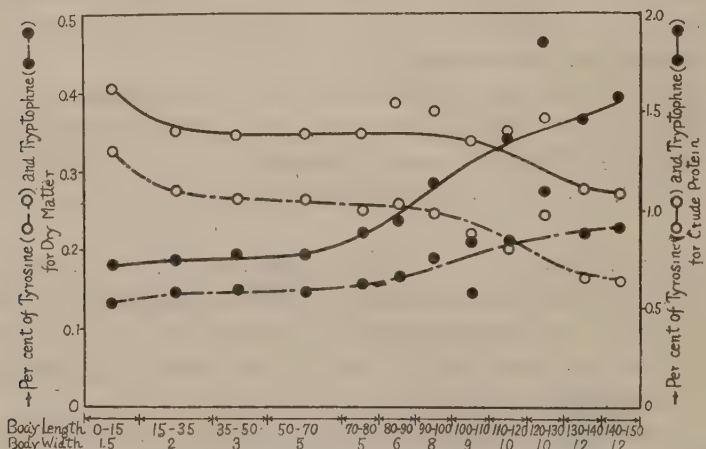


Fig. 2 Graphs showing the Variations of the Amount of Tyrosine and Tryptophane Contents in the Stage of Growth of *Laminaria japonica*

以上により粗蛋白量は生長と共に漸次減少することは明白であるが，これは生長と共に可溶性無窒素物が漸次增加するために，乾物に対する粗蛋白の割合が減少するのであつて，蛋白構成アミノ酸としてのチロシン及びトリプトファン含量には著しい增減がないと云えるであろう。而して強いてその增減の傾向とも云うべきものを求めるとチロシンは生長と共に漸次減少し，トリプトファンは逆に增加する傾向にあるが，実験期間並びに分析試料の少ないこの実験において，これを一般的な傾向として取上げることは不適当と思われる。この点に関しては更に詳細な実験を重ねることによつて一層明確に論究して見たいと思う。

4 要　　約

O. Folin & A. D. Marenzi 法によつて各種海藻中のチロシン及びトリプトファン含量を測定し次の結果をえた。

1. チロシン含量は綠藻においては0.95～1.74%，褐藻においては1.58～5.70%，紅藻においては1.48～4.75%にあり，褐藻，紅藻蛋白中のチロシン含量は他の動植物蛋白に比し少しも遜色がない。而して綠藻におけるチロシン含量は褐藻及び紅藻に比し著しく劣るが皆無ではない。

2. トリプトファン含量は綠藻においては0.41～2.50%，褐藻においては0.94～8.75%，紅藻においては0.54～2.35%にあつて，藻類相互間における異同は認められない。

3. マコンブの生長過程におけるチロシン及びトリプトファン含量の変化についてみるにチロシンは生長と共に漸次減少するが，トリプトファンは逆に漸次增加した。

本研究を遂行するに当り終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた本学部教授農学博士，医学博士村田喜一先生に深甚なる謝意を表する。又実験遂行に当り終始労を惜しまず協力された今野熙君に対し心から感謝するものである。

5 文　　献

(1) A. Mazur & H.T. Clarke : J. Biol. Chem., 123, 729～740 (1938)
(2) 高木光造：北海道大学水産学部研究彙報，1，77～80 (1951)
(3) O. Folin & A. D. Marenzi : J. Biol. Chem., 83, 89～102 (1929)
(4) 鈴木　昇：北海道大学水産学部研究彙報，3，68～72 (1952)
(5) 大谷武夫，富士川　潔：海藻の化学，1版，厚生閣，東京，(1935)，p. 10
(6) 斎藤　要：鹿児島大学水産学部紀要，2，71～79 (1952)
(7) A. Leman : Bull. Soc. Chim. France, 18～19 (1950)
(8) P. Mastagli & J. Augier : Compt. rend., 229, 775～776 (1949)
(9) 高木光造：北海道大学水産学部研究彙報，2，31～42 (1951)

(水産科学研究所業績 第168号)

海藻に関する化学的研究

第8報　各種海藻中のスレオニン及びセリン含量に就て

高　木　光　造　(水産食品化学教室)

CHEMICAL STUDIES ON MARINE ALGAE
VIII. THREONINE AND SERINE CONTENTS IN VARIOUS SPECIES OF MARINE ALGAE

Mitsuzo TAKAGI

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

Threonine and serine in various species of marine algae were determined by L. A. Shinn & B. N. Nicolet's method.

The results obtained are summarized as in Table 1.

1. The proportion of threonine content to crude protein was estimated as from 0.86 to 2.69% in green algae, 1.51 to 4.72% in brown algae, and 1.05 to 5.64% in red algae. Generally, the proportion of threonine content to crude protein in those marine algae shows from 1.5 to 2.5% in average, and it is remarkably lower than that of other plant and animal proteins.

2. The proportion of serine content to crude protein was estimated as from 4.98 to 14.30% in green algae, 4.22 to 20.36% in brown algae, and 6.94 to 19.56% in red algae. Generally, the proteins of those marine algae may be considered to be remarkably rich comparing with other plant and animal proteins in this amino acid, and this fact is characteristic of protein in marine algae.

1　緒　　言

海藻を食料品としてきわめて広範囲に利用している国情にも拘らず，その栄養価値についての研究特に海藻中に含まれる個々のアミノ酸含量に関する研究はわが国においては皆無である。著者は海藻の栄養価値を正確に決定するためにアミノ酸の種類と量とを明らかにする仕事の一環として，前報[1]においてチロシン及びトリプトファン含量について紹介したが，同時に海藻中のアミノ酸含量が明らかになれば，それによつて海藻蛋白の特性の一端を知ることも容易であり，又海藻相互間における系統発達の順位を決定することも可能であろう。そこで著者は引続きスレオニン及びセリン含量について，L. A. Shinn & B. N. Nicolet[2]による過沃素酸法に従つて測定を行い，こゝに興味ある実験結果をえたので報告するものである。

2　実験材料及び実験方法

〔1〕 供試試料……函館近郊の沿岸で採取したきわめて新鮮な試料を再三水洗した後風乾したもの及び市販品を更に100°Cの乾燥器中で30分加溫乾燥して粉末とし実験に供した。

〔2〕 測定方法……50cc容三角フラスコに試料約1gをとり，これに20% HCl 20ccを加え，コルク栓に約 50cm のガラス管を附し，沸騰湯浴中で約24時間加水分解する。こゝにえた加水分解液を減圧で数回濃縮し可及的に HClを追い出し，然る後水で稀釈，これに約1～2gの骨炭を加えて濾過し，濾液を 100cc とする。

A スレオニン

Fig. 1 に示す如く 2.5×20cmの3本の試験管をガラス管で接続する。Aの試験管には小型分液濾斗を附し，ガラス管の下端を試験管の底に達するようにし，尙コックにより CO_2の発生装置を接続出来るようにする。Aの試験管に供試液 5cc（3～10mg のスレオニンを含む）をとり，これに 1M $NaHCO_3$ 5cc と1Lに対し 20g の $NaHCO_3$を含む 0.1N $NaAsO_2$ 10cc を加える。次にBの試験管に 2% $NaHSO_3$ 5ccを，Cの試験管に同溶液 3ccをとり，両試験管を水で 25ccに稀釈する。分液濾斗には約 0.5M H_5IO_6 を入れる。次いで各試験管を連結し，CO_2 を通じて各試験管の内容を充分混合する。次いでコックを分液濾斗に連結し，0.5M H_5IO_6 1～2cc を加え，再びコックを CO_2の発生装置に連結し1分間 1Lの割合で1時間通気する。然る後B及びCの内容を混合し 0.02N I_2で滴定する。即ち I_2にてアセトアルデヒド（CH_3CHO）と結合しない $NaHSO_3$を滴定し，次に Na_2CO_3 2～3g を加え，CH_3CHOと結合した $NaHSO_3$ を遊離せしめ，これを0.02N I_2で滴定する。

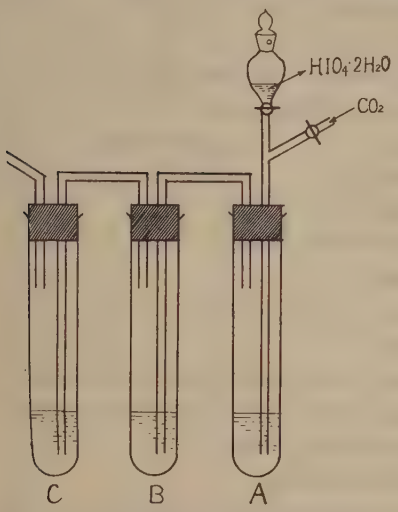


Fig. 1 Apparatus for the Determination of Threonine and Serine

0.02N I_2 1cc＝1.19mg スレオニン

B セリン

上記のスレオニン定量に用いた残液即ち CH_3CHO を除去した残液を 250cc の三角フラスコに移し，メチールレッド1滴を加え CH_3COOH で中和する。次いで必要量の約2倍に相当する0.4%ヂメドン溶液 2cc を加え，室温で48～72時間放置後硝子濾過板上に沈澱を捕集し，真空デシケーター中で乾燥秤量する。秤量後 m.p. を見るか，或いは混融試験により，フオルムアルデヒド（HCHO）のヂメドン誘導体であることを確める。HCHO のヂメドン誘導体の m.p. は189°C である。而して

ヂメドン誘導体 1mg ＝ 0.3596 mg セリン

著者は亦個々の試料について窒素を測定し，その値に係数を乗じて粗蛋白量を求め，粗蛋白に対するスレオニン及びセリン含量を求めて比較し，海藻蛋白の特性の一端を伺うことにした。

3 実験結果並びに考察

〔1〕 各種海藻中のスレオニン及びセリン含量に就て

以上の測定法に従つて各種海藻中のスレオニン及びセリンの定量を行つてえた結果は Table 1に示す如くで，Fig. 2 はこれを図示したものである。もとより同一の種類についても採取時期或いは採取場所の相違により，その含量は著しく異なるから，著者は採取条件を明示した。従つてこゝにえた実験結果はこの条件に制限された一つの分析値を表わすに過ぎないが，これを以て一応海藻蛋白の特性を論究して見たい。

Fig. 2 Graphs showing the Amount of Threonine and Serine Contents to Crude Protein in Various Species of Marine Algae

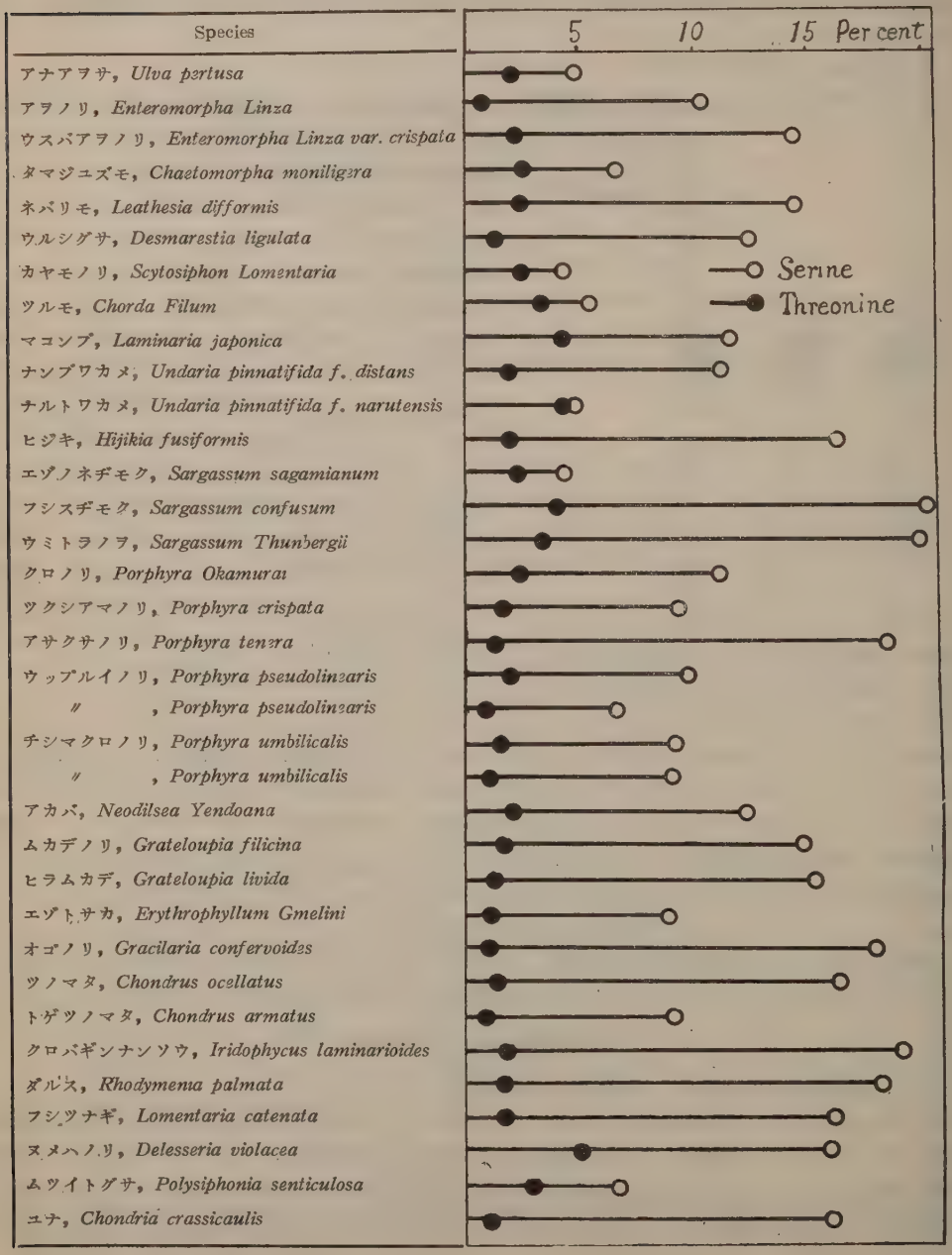


Table 1 Threonine and Serine Contents in Various Species of Marine Algae

	No.	Species	Plate of sampling	Date of sampling	Threonine in dry matter %	Serine in dry matter %	Crude protein %	Threonine in crude protein %	Serine in crude protein %
Green algae	1	アナアヲサ, *Ulva pertusa*	Nanaehama	May 8	0.703	1.651	33.16	2.12	4.98
	2	アヲノリ, *Enteromorpha Linza*	〃	Mar. 9	0.271	3.269	31.69	0.86	10.32
	3	ウスバアヲノリ, *Enteromorpha Linza var. crispata*	〃	May 2	0.400	2.562	17.91	2.23	14.30
	4	タマジユズモ, *Chaetomorpha moniligera*	〃	June 25	0.494	1.244	18.36	2.69	6.78
Brown algae	5	ネバリモ, *Leathesia difformis*	Moheji	June 14	0.135	0.790	5.52	2.45	14.31
	6	ウルシグサ, *Desmarestia ligulata*	Nanaehama	May 2	0.321	2.669	21.30	1.51	12.53
	7	カヤモノリ, *Scytosiphon Lomentaria*	〃	〃	0.447	0.787	18.64	2.40	4.22
	8	ツルモ, *Chorda Filum*	Moheji	June 14	0.340	0.571	10.35	3.29	5.52
	9	マコンブ, *Laminaria japonica*	Nanaehama	Apr. 25	0.422	1.140	9.96	4.31	11.45
	10	ナンブワカメ, *Undaria pinnatifida f. distans*	〃	Apr. 28	0.469	2.571	22.84	2.05	11.26
	11	ナルトワカメ, *Undaria pinnatifida f. narutensis*	——	——	0.469	0.490	9.93	4.72	4.93
	12	ヒジキ, *Hijikia fusiformis*	Moheji	——	0.193	1.432	8.86	2.18	16.16
	13	エゾノネヂモク, *Sargassum sagamianum*	Nanaehama	June 4	0.573	1.004	23.49	2.44	4.27
	14	フシスヂモク, *Sargassum confusum*	Moheji	June 14	0.283	1.405	6.90	4.10	20.36
	15	ウミトラノヲ, *Sargassum Thunbergii*	〃	〃	0.260	1.371	6.86	3.79	19.99
Red algae	16	クロノリ, *Porphyra Okamurai*	Ishikawa	Feb. 10	0.866	3.724	33.43	2.59	11.14
	17	ツクシアマノリ, *Porphyra crispata*	Kumamoto	Feb. 20	0.636	3.218	34.11	1.86	9.43
	18	アサクサノリ, *Pophyra tenera*	——	——	0.464	6.568	35.21	1.32	18.65
	19	ウップルイノリ, *Porphyra pseudolinearis*	Oshoro	——	0.601	2.786	27.94	2.15	9.97
	20	〃 , 〃	Nanaehama	Jan. 25	0.415	2.753	39.66	1.05	6.94
	21	チシマクロノリ, *Porphyra umbilicalis*	Abashiri	——	0.599	3.139	34.22	1.75	9.17
	22	〃 , 〃	Nemuro	Feb. 20	0.434	2.858	31.33	1.38	9.11
	23	アカバ, *Neodilsea Yendoana*	Moheji	June 14	0.225	1.185	9.52	2.36	12.45
	24	ムカデノリ, *Grateloupia filicina*	Nanaehama	Feb. 1	0.520	4.030	26.75	1.94	15.07
	25	ヒラムカデ, *Grateloupia livida*	〃	〃	0.501	4.928	31.25	1.60	15.77
	26	エゾトサカ, *Erythrophyllum Gmelini*	〃	〃	0.375	2.383	25.87	1.45	9.21
	27	オゴノリ, *Gracilaria confervoides*	Moheji	June 14	0.189	2.188	11.96	1.58	18.29
	28	ツノマタ, *Chondrus ocellatus*	Nanaehama	Feb. 1	0.460	4.228	25.08	1.83	16.86
	29	トゲツノマタ, *Chondrus armatus*	〃	〃	0.297	2.100	22.17	1.34	9.47
	30	クロバギンナンソウ, *Iridophycus laminarioides*	〃	Apr. 24	0.416	3.680	18.81	2.21	19.56
	31	ダルス, *Rhodymenia palmata*	〃	〃	0.439	3.963	21.38	2.05	18.54
	32	フシツナギ, *Lomentaria catenata*	〃	Feb. 1	0.402	3.202	19.59	2.05	16.35
	33	ヌメハノリ, *Delesseria violacea*	〃	May 2	1.424	4.075	25.27	5.64	16.13
	34	ムツイトグサ, *Polysiphonia senticulosa*	〃	〃	0.910	2.017	28.78	3.16	7.01
	35	ユナ, *Chondria crassicaulis*	〃	Feb. 1	0.415	5.193	31.79	1.31	16.34

以上より乾物中のスレオニン及びセリン含量は夫々0.135～1.424%及び0.490～6.568%にあつて、種類によりその含量には著しい差異が認められるが，窒素含量も亦著しく異なるから粗蛋白に対するスレオニン及びセリン含量を比較した方が海藻の栄養価値並びに蛋白の特性を明らかにするために妥当と考えられる。依つて粗蛋白に対するスレオニン及びセリン含量について見るにスレオニンは綠藻においては0.86～2.69%，褐藻においては1.51～4.72%，紅藻においては1.05～5.64%にあつて，綠藻，褐藻，紅藻を通じてスレオニン含量には特別の差異は認められず，海藻蛋白中のスレオニン含量は平均して1.5～2.5%にあることを知つた。これを他の動植物蛋白に比較すると，牛乳，牛肉，全卵等の動物蛋白中のスレオニン含量には遠く及ばないが，大豆，玉蜀黍，豌豆蛋白中のそれに稍々劣る程度で，小麦蛋白中のスレオニン含量にほゞ匹敵する。

一方セリンは綠藻においては4.98～14.30%，褐藻においては4.22～20.36%，紅藻においては6.94～19.56%にあつて，海藻蛋白中のセリン含量は平均して9～18%にあると云えよう。これを他の動植物蛋白中のセリン含量に比較すると著しく多く，これは海藻蛋白の特性の一つと思われる。

4 要　　約

L. A. Shinn & B. N. Nicolet 法によつて各種海藻中のスレオニン及びセリン含量を測定し，次の結果をえた。

1. スレオニン含量は綠藻においては0.86～2.69%，褐藻においては1.51～4.72%，紅藻においては1.05～5.64%にあり，平均すると1.5～2.5%にあつて他の動植物蛋白中のスレオニン含量に比し著しく劣る。

2. セリン含量は綠藻においては4.98～14.30%，褐藻においては4.22～20.36%，紅藻においては6.94～19.56% にあつて，海藻蛋白中のセリン含量は他の動植物蛋白中のそれに比し著しく多く，これは海藻蛋白の特性と考えられる。

本研究を遂行するに当り終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた本学部教授農学博士，医学博士村田喜一先生に深甚な謝意を表する。又実験遂行に当り終始労を惜しまず協力された名取喜昭君に対し心から感謝するものである。

5 文　　献

(1) 高木光造：北海道大学水産学部研究彙報，4，86～91（1953）

(2) L. A. Shinn & B. N, Nicolet : J. Biol Chem., 138, 91～96（1941）

（水産科学研究所業績 第169号）

塩辛の細菌学的研究

第5報　細菌の蛋白質分解酵素について（其の1）
Bacillus subtilis の蛋白質分解酵素の二，三の性質について

第6報　細菌の蛋白質分解酵素について（其の2）
Bacillus subtilis の蛋白質分解酵素の賦活性物質について

長尾　清（水産細菌学教室）

BACTERIOLOGICAL STUDIES OF SHIOKARA OR "SOUSED SQUID"

5. On the Proteolytic Enzymes of Bacteria. (Part I)
Some Properties of the Proteolytic Enzyme of *Bacillus subtilis*.

6. On the Proteolytic Enzymes of Bacteria. (Part II)
On the Activator of the Proteolytic Enzyme of *Bacillus subtilis*.

Kiyoshi NAGAO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The present author prepared a proteolytic enzyme of *Bac. subtilis* which was isolated from Shiokara, by using either lysis, lyophilization, or treatment with acetone and ether. The enzyme showed optimal activity at pH of 6.8 to 7.2 and temperature of 40°C. It is of interest that the enzyme was not much affected by presence of a high concentration of sodium chloride. The proteolytic activity of an enzyme prepared by acetone-ether treatment was nearly the same to that by lyophilization, whereas that of an enzyme prepared by lysis was lower than the others.

This enzyme was activated by either Mn^{++}, or cysteine. When Mn^{++} was added at the start of hydrolysis, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place. When the enzyme was treated, however, with Mn^{++} at 37°C. for about three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place without any lag according to the first order reaction. This suggests that the activation may give rise as a results of combination of the metal with enzyme protein. The proteolytic activity ran parallel with the concentration of Mn^{++} within a certain range of the concentration. In case of cysteine, on the contrary, a higher activity was obtained when it was mixed simultaneously with the enzyme and the substrate. These experimental results are shown in Figs. 6,7,8 and 9.

細菌の蛋白質分解酵素は非常に多数ある様に見える。しかし動物の蛋白質分解酵素に関する研究に比較すると、其の研究は非常に少ない。

Maschmann[1] は或る細菌の培養液から得た蛋白質分解酵素につき広汎な研究をし、次の3種の蛋白質分解酵素を得ている。即ち (1) *Bac. pyocyaneus, Serratia marcescens* の培養液から Egg albumin や Clupein を含む多数の蛋白質を分解し、賦活性物質として Cysteine を必要としない酵素、(2) ガスを生成する嫌気性細菌の培養液から Gelatin と Gluten のみを分解する酵素、及び (3) *Bac. botulinus* から SH 化合物とシアン化物に依つて活性化される酵素を得ている。

Gelatin を分解する酵素は広く多くの細菌に存在し Bidwell[2], Kocholaty[3], Evans[4], Ramon[5], Gorini[6] 等の研究がある。Kocholaty[3] は *Clostridium histolyticum* の培養液から Gelatin を分解する酵素を得た、この酵素の最適水素イオン濃度は pH 6.0～7.5 で、電気泳動的に均一な蛋白質で、少量の Tyrosine と Tryptophane を含み、Fe^{++} と SH 化合物に依つて活性化される。Gorini[6] は *Micrococcus lysodeikticus* から Gelatin や Casein を分解する酵素を得た、この酵素は 0.01M Ca^{++} を加えると活性化される。

著者は塩辛の熟成現象を細菌学的に研究して来た。一般に魚肉が自家消化を起す場合には、蛋白質はアミノ酸にまで分解され、それ以上は分解されないと言われている。アミノ酸は細菌の酵素により脱炭酸や脱アミノされて分解する。しかもこの様な低級分子にまで分解する速度は他の動物組織から得られる酵素に比し迅速に行われるものと考えられる。著者は塩辛の熟成に関与する細菌がいかなる機構により蛋白質を分解するか、即ち蛋白質の Peptide 結合の切れる様子、Exopeptidase であるか Endopeptidase であるか否か、いかなる Peptide 結合を分解するかを究明し、更に進んでアミノ酸の分解機構、アミノ基転移の機構を究明したい。

本報に於ては著者が塩辛中より分離した *Bac. subtilis* を使用し、細菌々体を Acetone-Ether 処理及び冷結真空乾燥処理に依つて得た乾燥菌体より酵素を抽出し、又 Lysozyme にて細菌々体を溶解し酵素液を得た。これ等の酵素の Gelatin を基質とした場合の最適水素イオン濃度、最適温度、酵素抽出法の差異による活性度の比較、食塩の影響及び酵素の賦活性物質につき研究した結果について報告する。

実 験 方 法

(I) 酵素抽出法

細菌々体より酵素を抽出するには次の様な方法がある[7][8]

①細菌々体を微細な硬い粒子と混ぜて磨擦して破壊する方法、②或る範囲の振動数の超音波を菌体浮遊液にあて細胞構造を破壊し、酵素を抽出する方法、③加圧状態で高速度に廻転する Ball-mill で機械的に破壊する、④細菌々体を自家分解する方法、⑤溶菌性物質を加えて溶菌する方法、⑥細菌々体を冷結真空乾燥する方法、⑦細菌々体を Acetone Ether で処理して乾燥粉末を得る方法

①②及び③の方法では特殊な器具を必要とし、④の方法では自家分解中に酵素の活性が低下する。⑤の方法で溶菌性物質を加えて溶菌させる著名な方法は、Lysozyme に依る溶菌作用である。Lysozyme に依る溶菌作用は Penrose, Quastel 両氏[9]が発見し、其の後 Herbert[10]が *Micrococcus lysodeikticus* を Lysozyme にて溶菌し、結晶性細菌 Catalase を得ている。Lysozyme は *Micrococcus lysodeikticus*[10][11], *Achromobacter fischeri*[12], *Bac. subtilis*[13][14][15], *Bac. megatherium*[16] を溶菌するが、*Bac. anthracis* に対しては溶菌しない。

著者は以上の方法の中⑤⑥⑦の方法で細菌々体より酵素を抽出した。

即ち Bouillon (broth) 培地に *Bac. subtilis* を接種し、37 C にて24時間培養し、発育した菌苔を集め

水洗後、濾紙にて水分を吸い取り、湿潤菌体を得た。溶菌法にて酵素を抽出する為に著者はこの湿潤菌体の Cell Suspension (Non-proliferating Cell 又は Resting Cell とも云う) に Lysozyme を加え菌体を溶菌し、遠心分離、上澄液を酵素液とした。Lysozyme は G. Alderton 法[17]に従い、卵白より結晶状に抽出したものを使用した。冷結真空乾燥する場合には著者は Fig. 1 に示す如き冷結真空乾燥装置を使用した。Fig. 1 のA部に Dry ice と Ether を注入、B部のナス型フラスコに湿潤細菌々体を入れ、C部を真空ポンプに連結し、冷結真空乾燥を行い乾燥菌体を得た。

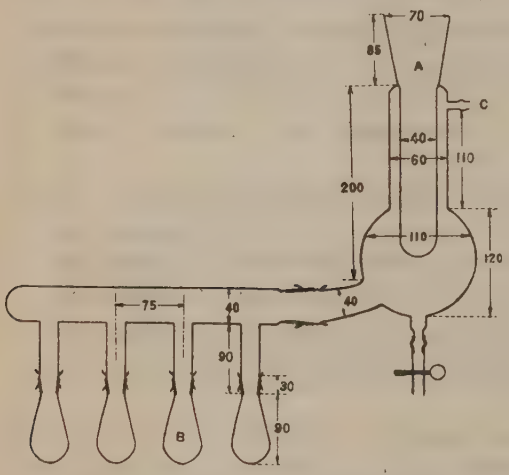


Fig. 1　Lyophilizing Apparatus

Acetone-Ether で処理して乾燥粉末を得るには湿潤菌体を冷Acetoneで処理、冷Acetone-Ether で処理後、冷Ether で脱水、デシケーターに入れ乾燥粉末を得た。この様にして得られた乾燥菌体に 75% Glycerine を加え、メノー乳鉢にてよくつぶし、酵素を抽出後、遠心分離し上澄液を酵素液とした。

(II)　最適水素イオン濃度の測定

0.1% Gelatin 溶液8cc、0.067M 燐酸Buffer 溶液8cc、酵素液4cc を混和、37°C の恒温水槽中におき一定時間後 NH_2-N量の増加を Folin の Naphthoquinone 法 (保利氏の改良法[18]) で比色定量した。比色には 470mμ の Filter を用い、光電比色計を使用した。NH_2-N量を測定する際、分解しないで残つている Gelatin を除かなければならないので、Gelatin除去法は、柏田、柿本氏法[19]で行つた。即ち前記の混液 2cc に 10%醋酸鉛溶液を加えて、生ずる沈澱を濾別し、濾液に稀硫酸を加えて過剰の醋酸鉛を除去する。その濾液が酸性ならば苛性ソーダで中和した後、Folin-Wu 試薬 (10%タングステン酸ソーダ1容に対し⅔N H_2SO_4 2～3容) を加え、暫時放置後濾過し、$^N/_{10}$ H_2SO_4 にて洗滌した濾液を合せ、この濾液について Folin法で Naphthoquinone で呈色させ、過剰の Naphthoquinone を脱色剤で脱色し、この液を一定量 (18cc) とし、この液より7cc をとり (Cüvett容量 7cc、厚さ1.5cm) NH_2-N量を比色測定した。0時の試料の透過率を 100%に合せ、時間の経過と共に NH_2 N量の増加、減少に相当する透過率の変化を見た。煮熱を加え変性させた酵素液を使用した場合には、NH_2-N量の増加は見られなかつた。

一般に蛋白質を酵素にて分解する際には、等量の α-COOH基と α NH_2基を生ずるが、Gelatin の場合は、Proline や Hydroxyproline の様な Imino基を含む Peptide 結合を多く含む蛋白質であるので[20] (Gelatin の主なアミノ酸含量は、Glycine 25.5%、Proline 19.4%、Hydroxyproline 9.4%、Arginine 9.1%、Alanine 8.7%、Leucine 7.1%、Lysine 5.9%、Glutamic acid 5.8%である。[21]) 分解されると NH_2基よりもCOOH基を多く生ずる。著者は基質として Gelatin を使用したので、細菌の酵素に依り Gelatin を分解した際にも、α-NH_2基よりも α COOH基を多く生ずると思われるので Formól 滴定に依り測定して見たが滴定の終点が不明瞭で、やゝ不正確であるので今度は省略した。

実験結果を Fig. 2, 3に図示した。以上の実験結果から *Bac. subtilis* の蛋白質分解酵素の最適水素イオン濃度は pH 6.8～7.2附近にある。

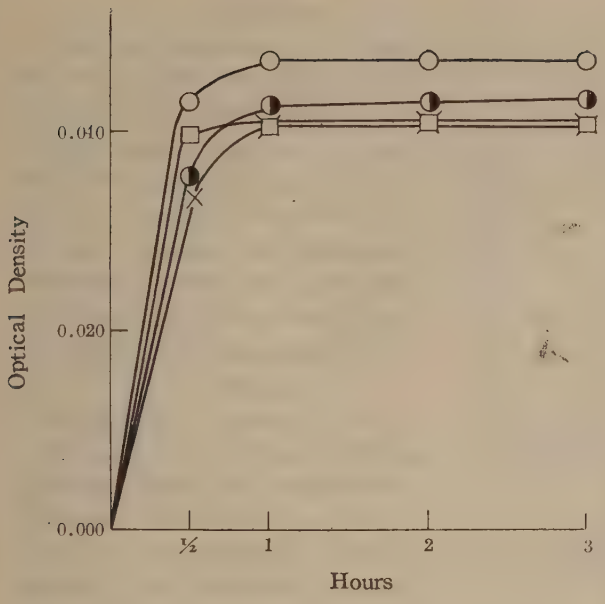


Fig. 2 The effect of pH on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B. subtilis*. Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9857g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine.

× pH5.0 □ pH6.0
○ pH7.0 ◑ pH8.0

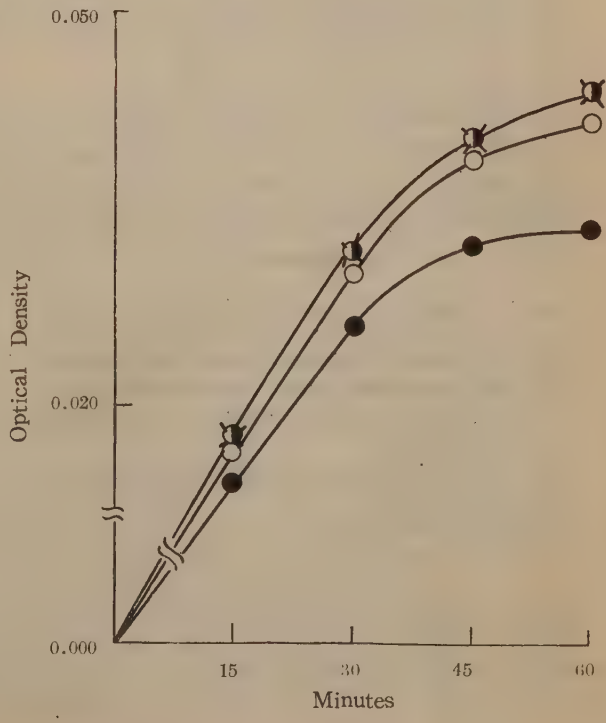


Fig. 3 The effect of pH on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B. subtilis*. Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.8435g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine.

○ pH6.8 ◑ pH7.0
× pH7.2 ● pH7.4

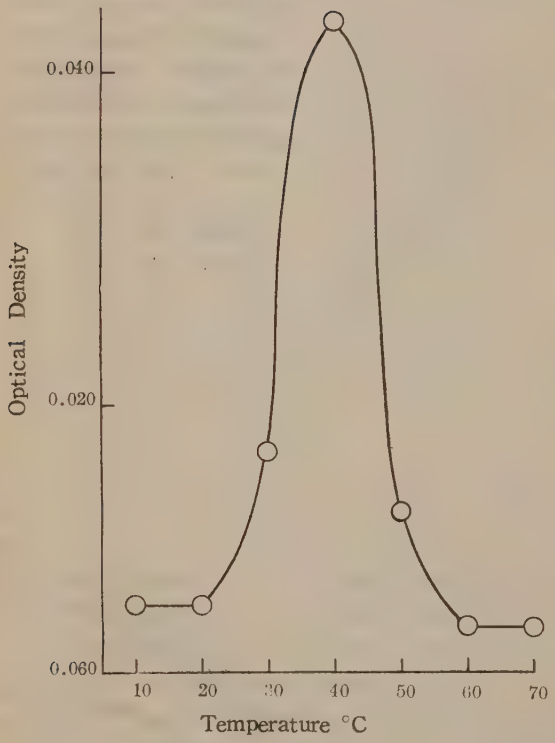


Fig. 4 The effect of temperature on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B. subtilis*. Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9335g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.
Optical density was measured thirty minutes after mixed.

（Ⅲ） 最適溫度の測定

最適水素イオン濃度測定の場合と同様に0.1%Gelatin溶液 8cc、Buffer溶液8cc(pH 7.0)、酵素液4ccを混和、各溫度の恒溫水槽中に保ち、30分後、上記混液2ccにつき未分解の Gelatinを除いた液中の NH_2-N量を Folin 法にて比色定量した。

実驗結果を Fig. 4に図示した。以上の実驗結果より *Bac. subtilis* の蛋白質分解酵素の最適溫度は40°C附近である。

（Ⅳ） 酵素抽出法の差異に依る酵素活性度の比較

著者は *B. subtilis* の菌体を冷結真空乾燥及び Acetone-Ether乾燥に依り得られた菌体粉末を 75% Glycerine溶液に入れ、抽出した酵素液及び Lysozymeに依り溶菌し、得た酵素液の活性度を比較した。実驗方法は最適水素イオン濃度測定の場合と同様。但し測定溫度 37°C、pH 7.0 で行つた。今蛋白質分解反応を単分子反応と仮定すると、活性度は次の様にして算出する事が出来る。

$$K=\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x},\qquad C_s=\frac{K}{E}$$

K : First order velocity constant.
a : Total NH_2-N in mixed solution. (hydrolyse with HCl)
x : NH_2-N after t min. in mixed solution.
t : Time. (min.)
C_s : Proteolytic coefficient.
E : Enzyme concentration. (mg. Nitrogen per cc)

実驗結果を表示すれば Table 1 の如くになる。

Table 1 Comparison of the Proteolytic Activity of the Enzyme Prepared by Acetone-Ether Treatment, Lyophilization and Lysis Method from *B. subtilis*.

Time (Min.)	Acetone-Ether Treatment *		Lyophilization **		Lysis Method ***	
	Optical Density	NH_2-N mg.	Optical Density	NH_2-N mg.	Optical Density	NH_2-N mg.
0	0.000		0.000		0.000	
10	0.018	0.006	0.022	0.008	0.004	0.002
20	0.032	0.012	0.036	0.014	0.009	0.004
30	0.041	0.016	0.046	0.018	0.013	0.005
40	0.046	0.018	0.051	0.020	0.022	0.008
60	0.046	0.018	0.051	0.020	0.032	0.012

* 0.8825g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine, 0.0122mg-N per 1 cc of enzyme solution, 0.0048mg-N of enzyme per 2 cc of mixed solution, a=0.1080mg NH_2-N in 2 cc of mixed solution.

** 1.0988g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine, 0.0156mg-N per 1 cc of enzyme solution, 0.0062mg-N of enzyme per 2 cc of mixed solution, a=0.1092mg NH_2-N in 2 cc of mixed solution.

*** Wet bacteria (dry weight 0.4262g.) in 60 cc of water, 0.0062mg-N per 1 cc of enzyme solution, 0.0024mg-N of enzyme per 2 cc of mixed solution, a=0.1025mg NH_2-N in 2 cc of mixed solution.

実験結果より Acetone-Ether 乾燥法、冷結真空乾燥法及び溶菌法に依つて得た酵素液の C_s を夫々 C_s^1, C_s^2, C_s^3 とすれば　$C_s^1 = 0.20$, $C_s^2 = 0.21$, $C_s^3 = 0.13$

即ち Acetone-Ether乾燥法と冷結真空乾燥法では活性度は殆んど同じであつたが、溶菌法に依つて得た酵素液の活性度は前二者に比し劣る。これはこの方法に依つて得た酵素液は水溶液でありGlycerine溶液に比し不安定な為と、溶菌してから実験に供するまでに48時間を経過していた為活性度が低下した為と思われる。

(V) 食塩の影響について

塩辛中には約15～20%の食塩が含有されている。塩辛の熟成に関与する細菌は、好塩細菌或は耐塩細菌と思われる。本実験に使用した *Bac. subtilis* は著者が塩辛中より分離した菌であるので、試験菌より抽出した酵素は高濃度の食塩を含有する基質に対しても相当に強く作用すると思われるので、以下この点を究明した。

0.1% Gelatin 溶液 8cc、0.067M 燐酸 Buffer 溶液（pH7.0）8cc、酵素液 4cc、を混和、この混合液に対し NaCl 濃度が10%及び15%となる如く NaCl（化学用）を添加した。NaCl無添加の場合を対照試験として行つた。これ等の混液を37°C の恒溫水槽中に保ち、30分後、前同様上記混液 2cc につき未分解の Gelatin を除いた液中の NH_2 N 量を Folin 法にて比色定量した。

実験結果を Fig. 5 に図示した。以上の実験結果より、供試菌は塩辛中より分離した為、相当高濃度の食塩に対し適応しておる様で、食塩を加えない基質と、10%になる様食塩を加えた基質に対する活性度は殆んど差異はない。15%になる様に食塩を加えた基質に対しては、やゝ活性度は低下する。

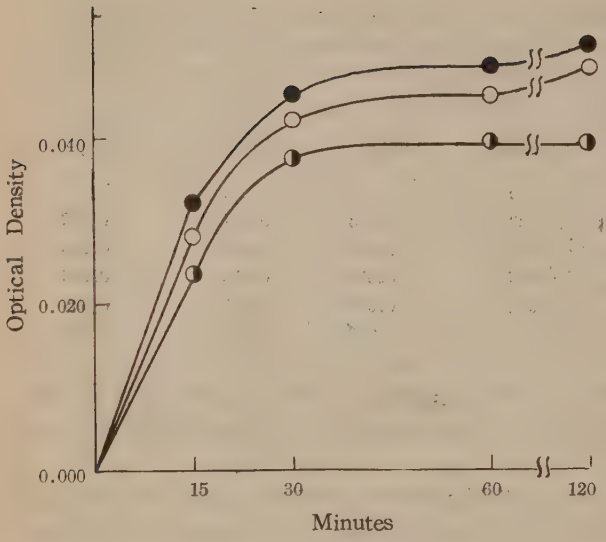


Fig.5 The effect of the concentration of NaCl on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B.subtilis*. Enzyme solution was prepapared by treatment with acetone and ether. 0.9275g. of bacterial powder in 50cc of 75%glycerine.

● Not added
○ 10%NaCl added
◑ 15%NaCl added

(VI) 賦活性物質について

細菌の蛋白質分解酵素に関する従来の研究では、細菌の培養液から SH化合物、シアン化物、Fe^{++} 或は Ca^{++} 等に依つて活性化される酵素が得られている。著者は細菌々体より抽出した酵素について Mn^{++} 及び Cysteine に依る活性化につき実験を行つた。

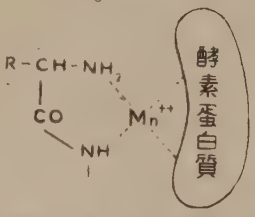
従来 Willstätter 一門の研究によつて Proteinase と Peptidase とがはつきり区別せられ、前者は高分子の天然の蛋白質にのみ作用してこれを Polypeptide にまで分解する酵素で、Peptidase は天然の蛋白質に対しては作用しないが種々の Polypeptide又は Dipeptideに作用するものと考えられていた。しかし M. Bergmann 等は1932年新らしい Polypeptide の合成法を考案して多数の Polypeptide について研究した結果、これ等の合成 Polypeptide の中には従来天然の蛋白質のみに作用すると考えられていた Proteinaseによつて容易に分解されるものが見出された。Bergmannは蛋白質分解酵素を Exopeptidase（遊離の極性基に隣接した Peptide 結合を分解する酵素）と Endopeptidase（Proteinaseとも云い、蛋白質の Peptide 鎖の内部を切断する酵素）とに分けている。

著者の実験に供した酵素液は恐らく色々な酵素の混合したものと思われ、しかも基質として使用した Gelatin は特異な蛋白質で、その主なる構成アミノ酸は Glycine, Proline, Hydroxyproline や Leucine 等である。著者の使用した酵素が Gelatin を分解する事と、Gelatin の構成アミノ酸から考察すれば、著者の使用した酵素には Leucine aminopeptidase, Glycyl-L-leucine dipeptidase, Prolidase や Prolinase 等が共存していると想像された。しかも動物組織から得られた之等の Exopeptidase は Mn^{++} に依つて活性化される事が知られている[22][23][24][25][26]。Maschmann 等の細菌酵素に関する研究では Cysteine が賦活性物質として作用するか否か問題になつている様であるので、著者は Mn^{++} と Cysteine に依る影響につき実験を行つた次第である。

Mn^{++} 等に依つて活性化される所謂金属酵素は、Mn^{++} と酵素蛋白質との間に次の様な緩慢な反応が行われる[27][28]。金属原子は Apoenzyme と同じ様に基質との結合の配位中心（Coordination center）となる。酵素－基質複合体に於て、金属イオンは一方では酵素の極性基と結合し、他方では

Peptide の極性基と結合する。この様にして夾合結合(Chelate ring)が形成され、Peptide 結合の電子構造が加水分解を行いうる程度にルーズにされるのである[29][30][31]。

$$\text{Protein} + Mn^{++} \rightleftarrows Mn^{++}\ \text{Protein}$$



卽ち Mn^{++} と酵素を数時間作用させた後基質を加えて分解したものと、同量の Mn^{++} と酵素及び基質を同時に加えて作用させたものを比較すると、前者の分解速度が大である。著者はこの点に留意して実験を行つた。

酵素液 2^{cc} に0.067M 燐酸 Buffer 溶液(pH7.0) 4^{cc} を加え、この中に Mn^{++} 及び Cysteine の濃度が夫々 10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M, 10^{-3}M, 10^{-2}M, となる如く夫々 $MnCl_2$ 及び Cysteine を加え、3時間37°Cの恒溫水槽中にて反応させた後、0.1% Gelatin 溶液8^{cc}と更にpH7.0の燐酸 Buffer 溶液6^{cc}を加え、37°Cに保ち、前回同様上記混液 2^{cc} につき未分解の Gelatin を除いた液中の NH_2-N量を Folin 法にて比色定量した。又酵素液 2^{cc} に燐酸 Buffer 溶液 4^{cc} 及びこの混液に Mn^{++}, Cysteine 濃度が夫々 10^{-2}Mとなる如く、$MnCl_2$ 及び Cysteine を加え、同時に燐酸 Buffer溶液 6^{cc} と 0.1% Gelatin 溶液 8^{cc} を加えたもの及びMn^{++}, Cysteineを全然加えないで行つたものにつき前同様の方法で NH_2-N量を比較した。

Fig. 6, 7, 8, 9 は実験結果を表示したものである。

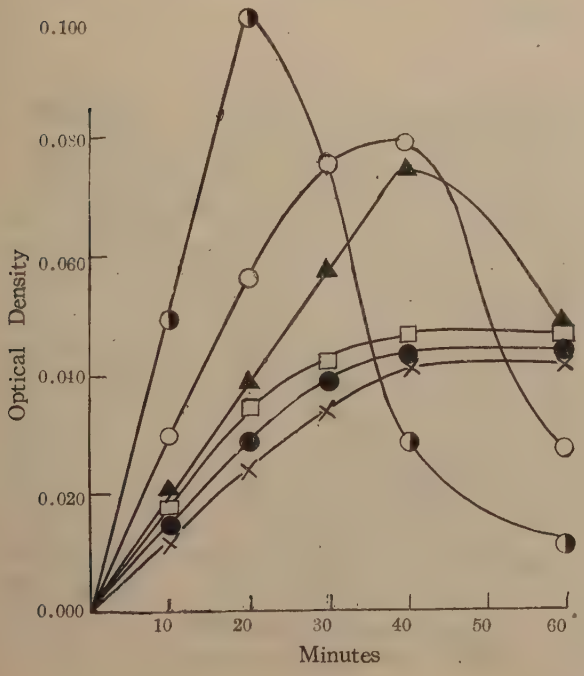


Fig.6 The effect of concentration of Mn^{++} on the hydrolysis of gelatin by the enzyme from *B. subtilis*.
The enzyme was treated with Mn^{++} at 37°C. in the presence of 0.067M phosphate buffer for about three hours before the substrate was added.

◑10^{-2}M Mn^{++} ○10^{-3}M Mn^{++}
▲10^{-4}M Mn^{++} □10^{-5}M Mn^{++}
●10^{-6}M Mn^{++} × No Addition
Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9346g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

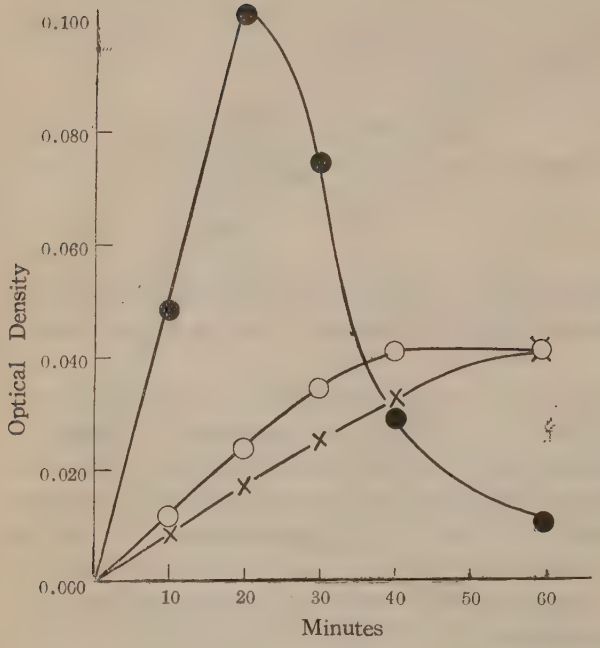


Fig.7 Activation of the enzyme by Mn^{++}. When Mn^{++} was added at the start of hydrolysis, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place. When the enzyme was treated, however, with Mn^{++} at 37°C. for about three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place without any lag according to the first order reaction.

● 10^{-2}M Mn^{++}+Enzyme, Preincubated.
× 10^{-2}M Mn^{++}+Enzyme+Substrate; Simultaneously.
○ No Addition

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9346g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

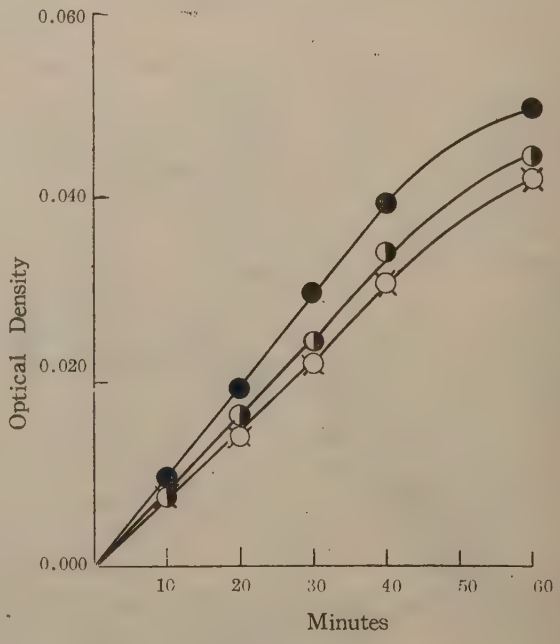


Fig.8 The effect of concentration of cysteine on the hydrolysis of gelatin by the enzyme from *B. subtilis*. The enzyme was treated with cysteine at 37°C. in the presence of 0.067M phosphate buffer for about three hours before the substrate was added.

● 10^{-2}M Cysteine
◑ 10^{-3}M Cysteine
○ 10^{-4}M Cysteine
× No Addition.

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.8925g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

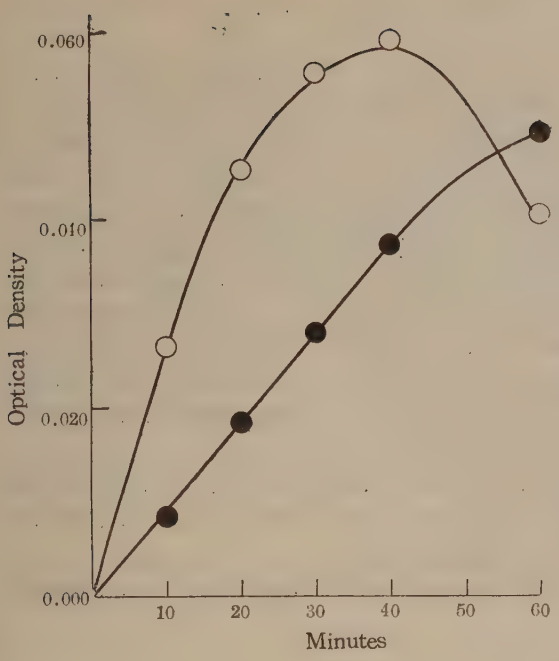


Fig.9 Activation of the enzyme by cysteine. When cysteine was added at the start of hydrolysis, hydrolysis took place without any lag according to the first order reaction, When enzyme was treated, however, with cysteine at 37°C. for about three hours before the substrate was added, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place.

● 10^{-2}M Cysteine+Enzyme, Preincubeted.
○ 10^{-2}M Cysteine+Enzyme +Substrate, Simultaneously.

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.8925g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

考　　察

塩辛より分離した*B. subtilis*の蛋白質分解酵素の最適水素イオン濃度はpH6.8～7.2附近である。最適温度は40°C附近である。細菌々体より酵素を抽出する方法の差異による酵素の活性度の差を比較して見ると冷結真空乾燥法と Acetone Ether 乾燥法では殆んど差異はなかつた。Lysozyme に依り溶菌し酵素を抽出する方法はやゝ前者に比して劣る様であるが、この方法に依つて得た酵素液は水溶液であり、Glycerine 溶液に比し不安定な為と、溶菌してから実験に供するまで48時間を経過していた為、活性度が低下したものと思われる。供試菌は塩辛中より分離した為、相当高濃度の食塩に対し適応しておる。即ち食塩を加えない基質と、10%になる様に食塩を加えた基質に対する活性度は殆んど差異はない。15%になる様に食塩を加えた基質に対しては、やゝ活性度は低下する。

著者の使用した酵素はMn^{++}及びCysteineに依り活性化される。基質として使用したGelatinは特異な蛋白質で、その主な構成アミノ酸はGlycine, Proline, Hydroxyproline, や Leucine等であり、著者の使用した酵素は恐らく多数の蛋白質分解酵素の混合したものと思われる。Gelatin の分解とその構成アミノ酸から考察すれば著者の使用した酵素には Leucine aminopeptidase, Glycyl-L leucine dipeptidase, Prolidase, や Prolinase 等が共存しているものと想像される。しかも動物組織から得られた之等の ExopeptidaseはMn++に依つて活性化される事が知られている[22,23,24,25,26]。著者の実験結果からMn^{++}に依つて活性化された酵素は恐らくLeucine aminopeptidase, Glycyl-L-leucine dipeptidase, Prolidase や Prolinase 等の Exopeptidaseであろうと思われるが、本実験結果から断定する事は勿論出来ない。EndopeptidaseがMn^{++}に依り活性化されたのかも知れないし或は又Endopeptidase

と Exopeptidaseの両者が Mn^{++} に依り活性化されたのかも知れない。この点については合成peptideを使用し、更に研究を進める予定である。

Mn^{++} は酵素の蛋白質と緩慢に作用し、化学的に結合する様で、Mn^{++} と酵素を3時間37°Cにて作用させた後、基質を加えた場合は、Mn^{++} と酵素及び基質を同時に加えた場合よりも活性度は大である。酵素の蛋白質の代りに基質蛋白質と Mn^{++} を3時間 37°C に作用させた後、酵素を加えた場合には、Mn^{++} と酵素及び基質を同時に加えた場合と活性度は同じであつた。以上の結果より酵素一基質複合体に於て、Mn^{++} は一方で酵素の極性基と結合し、他方ではPeptideの極性基と結合し、Peptide結合の電子構造が加水分解を行いうる程度にルーズにされた為に加水分解が促進されたものと思われる。又 Mn^{++} の濃度と活性度は正比例する。又 Mn^{++} の濃度が大である時速かに NH_2-N 量は増大するが或る量に達すると急激に NH_2-N が減少している。之は遊離されたアミノ酸が更に低級化合物に分解された為と思われるが、著者の行つたFolin法ではアミノ酸以外の物質でも呈色するものが多く、芳香属の一級アミンはアミノ酸と同程度に呈色し、アンモニア、一、二級の脂肪属のアミン等に依り阻害される。之等の物質が蛋白質分解過程中に生成された場合は、之等の物質の影響を受けておる事になるので、この点については後に詳細に研究する予定である。

之に反しCysteineに依り活性化される場合には、Cysteineと酵素及び基質を同時に加えた場合が一番活性化される。酵素と Cysteine を37°Cで3時間作用させた後、基質を加えた場合には前者に比し活性度は低下している。又Cysteine の濃度と活性度は正比例する。

Mn^{++} 及び Cysteine 以外に Co^{++}, Zn^{++}, Mg^{++}, Ascorbic acid 等に依る影響については次報に報告する予定である。

要　　約

著者が塩辛中より分離した *B. subtilis* の菌体より Acetone Ether 処理及び冷結真空乾燥処理に依つて得た乾燥菌体より酵素を抽出し、又 Lysozyme にて菌体を溶菌し酵素液を得た。之等の酵素のGelatin を基質とした場合の最適水素イオン濃度は pH6.8～7.2、最適温度は 40°C 附近である。又高濃度の NaCl を含有している基質に対しても作用する。之は高濃度の食塩に適応した為と思われる。Acetone Ether 処理と冷結真空乾燥処理によつて得た酵素の活性度は殆んど差がなかつたが、Lysozyme にて溶菌して得た酵素の活性度はやゝ低下していた。

著者が使用した酵素は Mn^{++} 及び Cysteine に依り活性化される。Endopeptidaseが之等賦活性物質に依り活性化された為か、酵素液中に共存している Exopeptidese が活性化された為か、或は Endopeptidase と Exopeptidase の両者が活性化された為か否かは不明である。Mn^{++} は酵素の蛋白質と緩慢に作用し、化学的に結合する様で、Mn^{++} と酵素を燐酸 Buffer 溶液と共に3時間37°C にて作用させた後、基質を加えた場合は、Mn^{++}、酵素、燐酸 Buffer溶液及び基質を同時に加えた場合よりも活性は大である。又 Mn^{++} の濃度と活性度は正比例する。之に反してCysteineに依り活性化される場合にはCysteine、酵素及び基質を同時に加えた場合が一番活性化される。

終りに臨み本研究に協力下された、柏原清之氏及び柳内直一氏に厚く謝意を表する。

文　　献

(1) E. Maschmann : Biochem. Z., 300, (1939), 89; 302, (1939), 332; 303, (1939), 145; 307, (1940), 1.
(2) E. Bidwell and W. E. van Heyningen : Biochem. J., 42, (1948), 140.
(3) W. Kocholaty and L. E. Krejci : Arch. Biochem., 18, (1948), 1.
(4) D. G. Evans : J. Gen. Microbiol., 1, (1948), 378.
(5) G. Ramon, R. Richou, and P. Ramon : Compt. rend., 220, (1945) 341.
(6) L. Gorini and C. Fromageot : Compt. rend., 229 (1949) 559.
(7) W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer (1951) : Manometric Techniques and Tissue Metabolism.
(8) E. F. Gale (1951) : The Chemical Activities of Bacteria.
(9) M. Penrose and J. H. Quastel : Proc. Roy. Soc., (London) B 107, (1930), 168.
(10) Herbert, D and Pinsent, A. J. : Science, 160, (1947),125.
(11) B. Baubudieri and G. B. Bietti : Archives of Ophthalmology, 34, (1945) 449.
(12) G. H. Warren and J. G. Durso : J. Bact., 64, (1952), 483.
(13) Laschtschenko, P : Z. Hyg. Infektionskr., 64, (1909), 419.
(14) E. H. Boasson : J. Immunol., 34 (1938) 281.
(15) L. A. Epstein and E. Chain : British Journal of Experimental Pathology, 21, (1940), 339.
(16) H. J. Walshiner and C. F. Robinow : J. Bact., 64, (1952), 483.
(17) Gordon Alderton, W. H. Ward and H. L. Fevold : J. Biol. Chem., 157, (1945), 43.
(18) 有山恒、志村憲助共著 (1951) : 蛋白質化学
(19) 柏田研一、柿本大壱 : 日水誌 18, (1952), 203.
(20) M. Bergmann, L. Zervas, and H. Schleich : Ber., 65, (1932), 1747.
(21) 赤堀四郎著 (1947) ; アミノ酸及び蛋白質
(22) E. L. Smith : J. Biol. Chem., 163, (1946) 15.
(23) E. L. Smith : J. Biol. Chem., 176, (1948), 9.
(24) E. L. Smith : J. Biol. Chem., 173, (1948), 553.
(25) J. S. Fruton : J. Biol. Chem., 166, (1946), 721.
(26) J. Berger and M. J. Johnson : J. Biol. Chem., 133, (1940), 639.
(27) E. L. Smith and M. Bergmann : J. Biol. Chem., 138, (1941), 789.
(28) E. L. Smith and M. Bergmann : J. Biol. Chem., 153, (1944), 627.
(29) E. L. Smith and L. T. Hanson : J. Biol. Chem., 176, (1948), 997; 179, (1948), 803.
(30) E. L. Smith : Ann. Rev. Biochem., 18, (1949), 35.
(31) E. L. Smith et al : J. Biol. Chem., 180 (1948), 33.

(水産科学研究所業績 第170号)

細菌の酵素に関する研究

第2報 *Micrococcus lysodeikticus* の Catalase について (其の1)

長尾 清 (水産細菌学教室)

STUDIES ON THE BACTERIAL ENZYMES

2. ON THE CATALASE OF *Micrococcus lysodeikticus*. (Part I)

Kiyoshi NAGAO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The catalase solution was obtained by the addition of lysozyme from *Micrococcus lysodeikticus*. The optimum pH and temperature of catalase activity of *Micrococcus lysodeikticus* were measured. The optimum pH was 7.5 and the optimum temperature was 32°C.

一部嫌気性細菌を除き殆ど総ての生物は Catalase を持つてゐる。細菌 Catalase に関しては、他の大多数の細菌酵素と同様未知の段階にある。其の主な理由は細菌の細胞から之等細菌酵素を破壊せずに抽出する事が困難であるからである。しかるに1930年に至り Penrose と Quastel[1]が Lysozyme を用いて細菌体から酵素を抽出する事に成功した。Lysozyme は卵白から結晶状に抽出する事が出来[2](卵白の蛋白質の約3%は Lysozyme である)、分子量は約17,000の低分子の塩基性蛋白質で、等電点は pH10.5—11.0であり、酸性溶液で安定、アルカリ性溶液でも比較的安定で、pH11.5 に於て5～6時間 Activity は減少しない[2]。Lysozyme は精巣より得られた "Spreading facter" である Hyaluronidase と酷似している[3]。

細菌の浮游液に Lysozyme を作用させると ($^{mgm.\ Lysozyme}/_{gm.\ bacteria}$) 菌体表面の Mucopolysaccharide を破壊し、菌体の滲透圧に変化を来たし、細菌浮游液の Turbidity は減少する。最近 Badudieri, Bietti 両氏[4]は電子顕微鏡で溶菌作用を観察している。又 G.H. Warren, J.G. Durso 両氏[5]は海水発光細菌 *Achromobacter fischeri* に対する Lysozyme の影響について電子顕微鏡で観察している。

最近 Herbert[6]は *Micrococcus lysodeikticus* を水に懸濁し、Lysozyme に依り溶菌し、結晶性細菌 Catalase を抽出する事に成功した。細菌の Catalase 含量は種類により異なるが、Herbert が *M. lysodeikticus* につき求めた値は約2%に達すると云う。即ち100gr.の菌体 (Dry Weight) から約2gの Catalase が得られる。細菌1細胞の Dry Weight を 2.5×16^{-13}gr. とし、Catalase の分子量を226,000～248,000として算出すると、細菌1細胞は約20,000分子の Catalase をもつている事になる。

著者は先ず G. Alderton 氏法[2]に依り卵白より Lysozyme を結晶状に精製した。次に Herbert の方法[6]に依り結晶状 Catalase を抽出し、その化学的性質を究明し様としたが Catalase の結晶化が困難にていずれも失敗した為、*Micrococcus lysodeikticus* を Lysozyme にて溶菌し、得た酵素液について最適水素イオン濃度及び最適温度を測定した。以下実験結果について報告する。

実 験 方 法

(1) Lysozyme の精製

G. Alderton 氏法[3]に従い卵白より Lysozyme を結晶状に抽出した。

(2) 試験菌

Micrococcus lysodeikticus※ を使用した。

(3) 酵素液の調製

Bouillon Agar に *Micrococcus lysodeikticus* を接種、27°Cにて96時間 Streak Culture し、発育した菌体を白金耳で集め、水洗後、菌体 (Dry Weight 112mg) を蒸溜水 40cc に懸濁し、之に菌体の約 1/1000重量の Lysozyme を添加、室温 (13°C)に100分間放置して溶菌させた。Turbidity の減少は肉眼に於て明確に認められ、殆ど透明なる溶液となる。之を濾過して酵素液とした冷蔵庫中 (−2°C)に保存した。Lysozyme に依る溶菌作用は100分以上更に長時間作用させた後 Catalase Activity を測定した結果、100分間作用させたものと Activity は同一であつた。

(4) 最適水素イオン濃度の測定

N/50 H_2O_2 15cc をとり、之に Buffer 溶液 5cc を加え、25°C の恒温槽に数分間保つた後、酵素液を一定量加え、5分間作用させた後、硫酸にて酵素作用を停止させた後 KI 及 $(NH_4)_2M_0O_4$ 液を加え、N/50 $Na_2S_2O_3$ 液にて滴定した。Buffer は 0.067M 燐酸 Buffer 及び Borate と NaOH を使用した[7,8]。Buffer 溶液の差異に依り酵素の Activity に相異はなかつた。各 pH に於ける 5 分後の Blanktest を行い計算に入れた。pH は硝子電極を使用して測定した。

(5) 最適温度の測定

実験に使用した酵素液は最適水素イオン濃度測定に使用したもので、調製後18時間経過したものである。0°Cより40°Cの間に 8 点をとり、前回と同様の方法にて Catalase 活性度を測定した。

実験結果並びに考察

(1) 最適水素イオン濃度

Table 1, 2, 3 に実験結果を表示した。

以上の実験結果から最適水素イオン濃度は pH 7.5 附近にある。

Table 1. The effect of pH on the catalase activity of *Micrococcus lysodeikticus* *

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later. (B)	(A)−(B)
5.0	5	14.60	0.96	13.64
6.0	5	14.60	0.25	14.35
7.0	5	14.60	0.14	14.46
8.0	5	14.60	0.15	14.45
9.0	5	14.60	0.20	14.40
10.0	5	14.60	0.25	14.35
11.0	5	14.60	0.30	14.30

* N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 1cc. was used.

※ Origin; Dept. Bacteriology, Washington University, School of Medicine.St. Louis. Mo. U. S. A. (1951, 21/IX)

Table 2. The effect of pH on the catalase activity of *M. lysodeikticus* **

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later.(B)	(A)-(B)
5.0	5	14.60	7.50	7.10
6.0	5	14.60	7.20	7.40
7.0	5	14.60	1.10	13.50
8.0	5	14.60	0.60	14.40
9.0	5	14.60	1.60	13.00
10.0	5	14.60	1.70	12.90
11.0	5	14.60	1.80	12.80

** N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 0.2cc. was used.

Table 3. The effect of pH on the catalase activity of *M. lysodeikticus* ***

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later. (B)	(A)-(B)
7.0	5	14.60	1.20	13.40
7.3	5	14.60	0.80	13.80
7.5	5	14.60	0.60	14.00
7.8	5	14.60	1.30	13.30
8.0	5	14.60	1.70	12.90
8.2	5	14.60	2.00	12.60
8.4	5	14.60	2.10	12.50
8.6	5	14.60	2.30	12.30
8.8	5	14.60	2.90	11.70
9.0	5	14.60	4.40	10.20

*** N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 0.2cc. was used.

(2) 最適溫度

Table 4 に実験結果を表示した。

以上の実験結果から最適溫度は 32°C 附近にある。

Table 4. The effect of temperature on the catalase activity of *M. lysodeikticus* ****

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later. (B)	(A)-(B)
0 C	5	14.60	9.60	5.00
10	5	14.60	9.40	5.20
20	5	14.60	9.00	5.60
25	5	14.60	8.60	6.00
30	5	14.60	8.50	6.10
32	5	14.60	8.40	6.20
35	5	14.60	8.50	6.10
40	5	14.60	8.70	5.90

**** N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 0.2cc. was used.

要　　約

Micrococcus lysodeikticus を Lysozyme にて溶菌し、得た酵素液について最適水素イオン濃度と最適溫度を測定した。卽ち最適水素イオン濃度は pH 7.5 附近、最適溫度は 32°C 附近にある。

終りに臨み、試驗菌株を分譲下された Prof. Samuel J. Ajl 氏 (Washington University). 文献複写の労を賜はつた阪大微生物病研究所、天野恒久氏に厚く謝意を表する。

文　　献

(1) Penrose M. and Quastel, J. H : Proc. Roy. Soc., B 107, (1930) 168.
(2) Gordon Alderton, W. H. Ward, and H. L. Fevold : J. Biol. Chem., 157 (1945) 43.
(3) Felix Haurowitz (1950) : Chemistry and Biology of Proteins.
(4) Badudieri and Bietti : Archives of Ophthalmology (1948)
(5) George H. Warren, and Jame G. Durso : J. Bact., 64 (1952) 483.
(6) Herbert, D., and A. J. Pinsent : Nature, 160 (1947) 125.
(7) Clark, W. M. (1920) : The Determination of Hydrogen Ions. Williams and Wilkins, Baltimore.
(8) W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer (1951) : Manometric Techniques and Tissue Metabolism.

(水産科学研究所業績 第171号)

噴火湾に於ける定置網の研究 (第二報)

自記ロープ張力計の試作

小林喜一郎・西沢敏 (漁業学科)

STUDIES ON THE FIXED NETS IN FUNKA BAY
II. ON THE AUTOMATIC RECORDING ROPE TENSIONMETER

Kiichiro KOBAYASHI and Satoshi NISHIZAWA

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

In response to the necessity of ascertaining the resistance of fixed-nets owing to tidal current, the authors designed an automatic recording rope tensionmeter as shown in Fig. 2, and made it by the courtesy of the Hakodate Dockyard. In the same Dockyard, preliminary tests were made. Then attaching it to the experimental fixed nets in Funka Bay, practical tests were made with a certain degree of success.

1. 緒　　言

噴火湾に於ける漁業について種々な角度から検討を加えるために、数年来多くの研究が行われているが、首題の定置網に関する研究は、主として急潮による損害防止及び漁網資材節約の問題をとりあげたものである。先に噴火湾に於ける定置網の急潮被害状況について報告[1]があつたが、其の後定置網にかゝる急潮の抵抗が実際上どの程度のものであるかを測定する必要が生じ、これまで二三の測定器[2]が試作されたのであるが、いづれも直読式のもので、荒天時海上にての実測が不可能に近いので勢い自記潮流計と併用せられる自記ロープ張力計が要求された。筆者等はこの研究を分担し、自記ロープ張力計を試作実験し、一応の成功をおさめたのでこゝに報告する。

2. 原理と構造

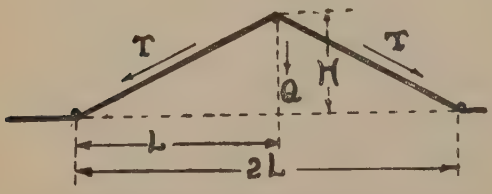


Fig. 1 Equilibrium of rope tension and load acting on the push rod.

Fig. 1 に示す如く、2個のローラーで押えたロープの中央に、他のローラーで側変位Hを与えた時、ロープの張力Tと中央ローラーの荷重Qとの間に次式[3]が近似的に成立する。

$$T = \frac{Q.L}{2H} \quad \cdots\cdots (1)$$

変位Hが変わらなければ、Tの値はQを測定することにより求められる。本器は此のQなる値をベローによつて油圧に変え、ブルドン管油圧計に導き、その指針を自記ペンに改造し、時計仕掛のドラムに捲きとられる紙の上にインクで記録せしめる如くしたものである。使用したベローの有効面積は19cm², L=30cmであるから、Hをcmで表わすと、ベロー内の油圧P kg/cm²とTとの関係は(1)式より

$$T = \frac{285\,P}{H} \quad (kg) \quad \cdots\cdots (2)$$

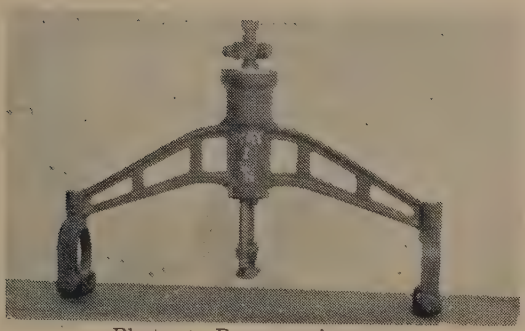


Photo 1. Rope tensionmeter

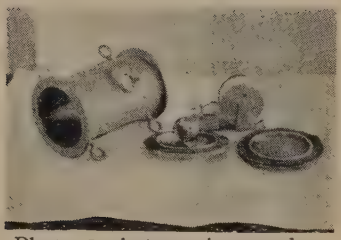


Photo 2. Automatic recorder

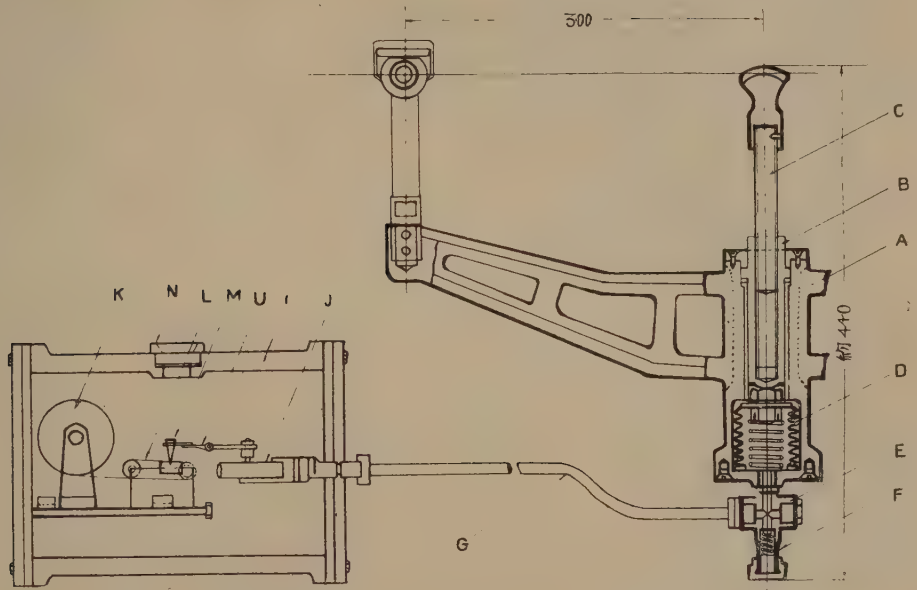


Fig. 2 Sectional view of automatic recording rope tensionmeter.

(A) frame (B) adjusting screw (C) push rod (D) bellows (E) joint
(F) safety valve (G) flexible pipe (I) automatic recorder case
(J) pressure gauge (K) rolating drum (L) recording paper (M) pen
(N) observing window (U) penholder

写真1は張力計、写真2は自記装置を示し、Fig. 2は本器の断面略図である。即ちフレーム(A)の内部にアヂヤステングスクリユー(B)が密合し、その内側に切つた角ねぢに噛み合つてプツシユロツド(C)がある。(B)の下端はベロー(D)に接し、ベローの他端には、接手(E)及び10kg/cm² 安全弁(F)を介して導管(G)によりブルドン管油圧計(I)に接続する。ベローから油圧計までの間には軽油を充満する。(J)は自記装置で、時計仕掛のローラー(K)に捲きとられる紙(L)の上に自記ペン(M)が画く。(N)は点視窓である。紙の移動速度は1時間31.8mm、時計は約90時間継続する。Fig. 3は ブルドン管油圧

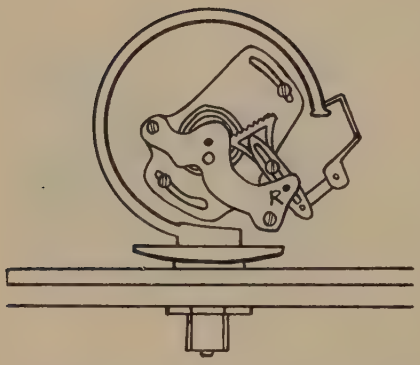


Fig. 3 Reconstruction of pressure gauge.

計の改造を示す。東洋計器製 10kg/cm² 油圧計のケース、文字盤、指針等を取外す。指針軸(O)の動きは0～10kg/cm²の範囲で280°分角あつて、ペン軸の移動としては大きすぎるので、その代りにラック歯車の支軸(R)にペンホルダー(U)をとり付けたものである。

3. 予備実験

予備実験に於ては、張力Tと自記ペンの変位円弧長Sとの関係を求めるのが目的である。梁にチエンブロックを取付け、これより径16粍のマニラロープを下げ、下端に重量を結び、ロープの中ほどに本器をセットした。用いた重量は 283.5kg, 570.6kg, 750.6kg 及びこれに 65kg を附加した 812.6kg の4種で又セット当初にロープに与えた中央変位は 30mmである。記録に際してはドラムを手で廻して紙の送り速度を早めてあるので時間軸は正確でない。記録結果を Fig. 4, 5, 6 に示す。記録が段階状になつているのはチエンブロックで吊上げる途中の重量が地面を離れるまでの変化のためで、この間の重量の値は測定していない。

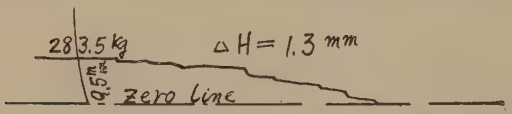


Fig. 4 A recording of pre experiment.

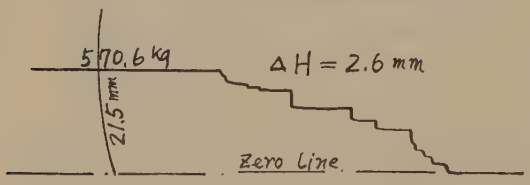


Fig. 5 A recording of pre-experiment.

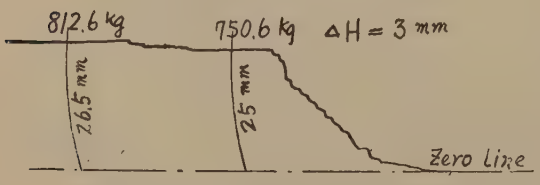


Fig. 6 A recording of pre-experiment.

此の実験中次の様なことが分つた。即ちベローから油圧計までの間は充分空気を抜き油を充満してあるから、油の非圧縮性によりロープ中央部の変位Hは不変に保たれるのを予期したのであるが、張力が増して圧力が大きくなると、僅かではあるがベローの膨脹とブルドン管の展伸とにより内容積が増し、従つてプツシユロッド(C)が入り込んでHの値が変つて来る。張力Tと、変位Hの変化量 ΔH 及びペンの変位円弧長Sとの関係を Fig. 7 に示す。この予備実験に於ては、中央変位Hのセッテングは、30mmだけであつたから、Hの他の値の時の変化量は測定してないが、本器の構造上、内圧により変化するものと考えられる。この内圧の値を Fig. 7 の結果を用いて(2)式より求め、Hの他の値、即ち、25mm, 20mm, 15mm の場合のTを逆に計算する。同時に、内圧とSとの関係も Fig. 7 から求められるから、結局、変位Sと張力Tとの関係が得られる(計算略)。尚此の場合、予備実験に於てはペンホルダーの長さが 90mmであつたがその後 82mm に改修したので、その修正量も入れて曲線に示したのが Fig. 8 である。これが本器のチヤートカーブである。

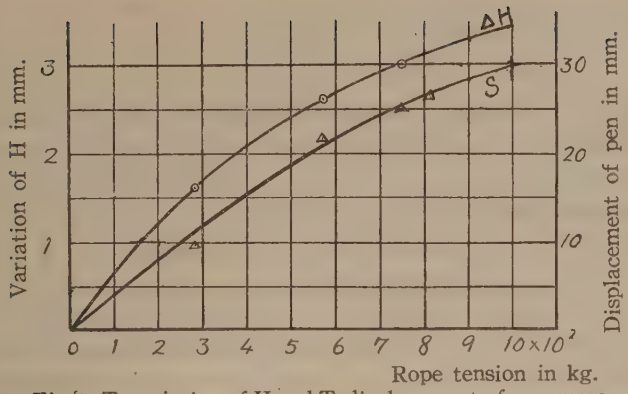


Fig. 7 T-variation of H and T-displacement of pen curve.

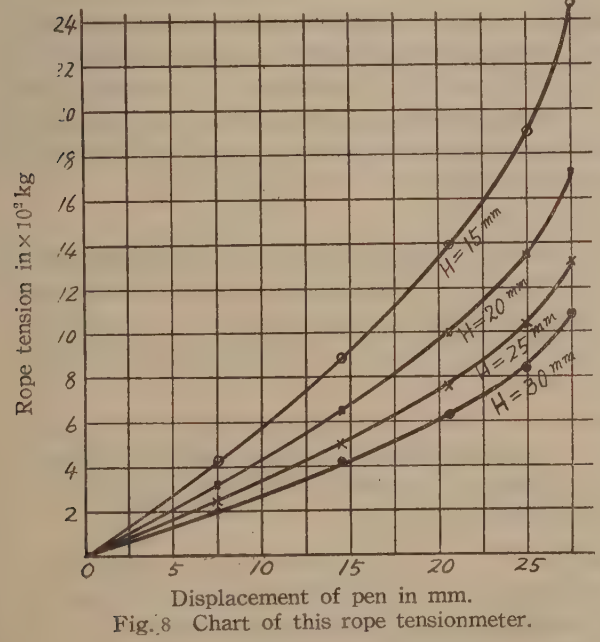


Fig. 8 Chart of this rope tensionmeter.

4. 噴火湾の試験定置網に於ける実地試験

噴火湾に於ける試験定置網の直径26mmのかかり網に本器を装着し海中に設置し、1952年10月6日より1週間実地試験を行つた。その結果の一部をFig.9に示す。図の中にFig.8により求めた張力の値を記入してある。

附　言

本研究は昭和27年度文部省科学研究費によつた。本研究に際しては本学部井上、川崎教授より多大の教導を得た。製作に際しては函館ドック猪木、三束氏、実験に際しては本学部出口、西山、中村の三氏、写真図面については高橋氏、漁船、試験網の貸与については尾白内西川氏に負うところ大である。

こゝに深甚の謝意を表す。

文　献

(1) 川崎、西山、中村：噴火湾に於ける定置網の研究(予報)、北大水研彙 Vol. 3, No.2.

(2) 川崎、西山、中村：碇網張力の測定方法について、日本水産学会北海道支部大会。昭和25年9月；井上：電気式碇網張力計に就て、未発表。

(3) 小林：曳綱張力計、北部日本海深海魚田調査報告 第三報、昭和27年8月

(水産科学研究所業績 第172号)

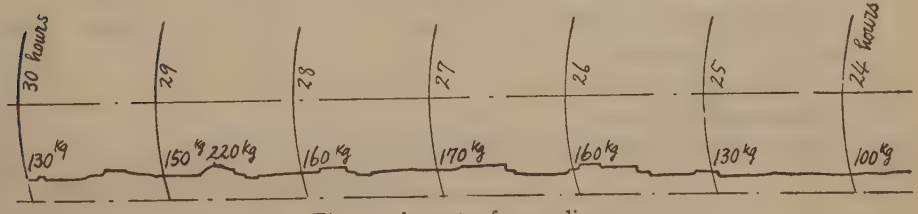


Fig. 9 A part of recording.

本学部教官研究業績

底曳漁場に就て　　斎藤市郎・三島清吉

北海道北西海域の底曳漁場の開拓を為すべく主として水深200～600m海底の底曳網漁業試験、利尻、礼文両島西方及び武蔵堆周辺等の遠隔漁場の探究等を実施し、200m 以深の深海には余り期待出来ないことを知つた。以上の調査を実施するに当つて音響測深機、手働測深機等を用いて、先づ各水域を精査し、然る後底曳網漁具を曳いて曳網の可否、水族の有無等を確かめた〔北部日本海深海魚田調査報告 第1報（昭和24年度）〕。

底曳網漁場及び漁具漁法に就て　　斎藤市郎・三島清吉

北海道北西海域の底棲魚に就て、その水平及び垂直分布（840m迄）の概略を把握し、又重要魚たるアブラガレイは太平洋側と異なり資源的に極めて少ないことを知つた。一隻曳に始めてトワイン網を使用し、網型も以西底曳の型を取入れ従来の網の1.5～1.7倍の漁獲成績を挙げた。従来底曳網漁具が海底に達する迄の時間が不明であつたので、電気深度計を以つて、沈降速度の予備的実験を行つた。なお市販されている径4寸の浮子硝子玉が840m 迄の深海では、破損率、8％であることを実験した〔北部日本海深海魚田調査報告 第2報（昭和25年度）〕。

底曳網漁場調査並に漁具、漁法の研究　　斎藤市郎・三島清吉・山本耕作・荒木辰夫

過去3ヶ年間の海底漁場調査を綜合すると、武蔵堆上は曳網殆んど不可能であり、その周辺では200～270m位迄は海底障害物が多く、操業稍々困難である。然し300m 以深になると大体操業差支えなく、主なる有用魚はタラ・スケソウダラ・ハツメ等であることが判つた。漁具沈降速度を電気深度計で実験した結果、12m/minなる事が判つた。なお水深840m 迄の曳網試験結果では、200m附近に漁獲最も多く、400mを限度として、それより深海には有用魚は殆んど見られないと言う結論を得た〔北部日本海深海魚田調査報告 第3報（昭和26年度）〕。

青森縣海底漁場に就て　　斎藤市郎

青森県東西海岸沖合の大陸棚は底曳網漁場としては荒廃して殆ど漁場価値を失なつていた。著者は昭和23年4月始めて音響測深機を海底漁場探索に利用し、同県下沖合に於ける200m 以深の海棚斜面と海棚上の取残された曳網可能水域を究明して該水域への進出を計り、又海底曳網障害地帯を確かめ漁具資材を保護節約するよう指導した。尚、北海道大島小島の中間にある浅所及び久六島周辺の全貌を明らかにした〔青森県水産資源調査報告（昭和23年度）第1号〕。

日本海に於けるネズミザメの回游に就て　　斎藤市郎・三島清吉

青森県に於ける重要漁業の対照魚たるネズミザメの延縄漁業試験に依り、その適水温及び多獲水温、游泳層、食餌、太平洋側と日本海側の魚体の相違、釣獲される雌雄の割合、回游経路及び時期等の概略を知り得たので、これ等を取纏めて報告した〔青森県水産資源調査報告（昭和24年度）第2号〕。

噴火灣近海の底質並に海底形状に就て　　谷田專治・斎藤市郎

噴火湾近海の底質は概ね泥質であるが、有珠沖は砂泥質で鹿部、尾札部側は礫質の処があつて、噴火湾口の中央部まで延びている。恵山岬附近は測深記録より岩盤底と推測された。噴火湾及び附近の海底は起伏殆どなく、恵山岬附近のみが急傾斜を以て深度を増し、海底複雑である〔北水試研究報告 第8号（昭和26年）北水試〕。

イカ完全利用に関する研究 第7報、スルメの膨化について　　谷川英一・小野寺博

スルメの膨化につき次の事項を研究した。

（1）スルメの水分量と膨化度との関係

（2）乾燥方法の差異と膨化度との関係

（3）pHと膨化度、及び種々の膨化液中に浸漬せる場合の膨化度と溶出蛋白量との関係

〔青森県水産資源調査報告 第3号（印刷中）〕

Biochemical Studies on the Urea in the Muscle of Elasmobranchiate Fish.
Part 1. Speciality and Mechanism of Development of Ammonia in the Shark Muscle.

Keiichi OHOISHI

サメ肉・アンモニアの生成は尿素の分解に基き、その分解は細菌によるものであり、またその細菌はサメ肉に固有のものではない。この場合のアンモニアの生成は途中で一時停止し後再び増加する。Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ., No. 62, 45 (1952).

Biochemical Studies on the Urea in the Muscle of Elasmobranchiate Fish.
Part 2. The Increase and Decrease of Urease in the Shark Muscle.

Keiichi OHOISHI

サメ肉ウレアーゼの活性はアンモニア生成時に著しいことを知り、さらにサメ肉より一定時間毎にウレアーゼ製剤を作りその活力を調べて再び同じ結果を得た。なお、ホシザメ鮮肉・ホシザメ肝臓・ネズミザメ肝臓からの製剤にもウレアーゼ活力を認めた。Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ., No. 62, 57 (1952).

サメ肉組織中の尿素について 大 石 圭 一

ホシザメ、ドチザメ肉を STUEBEL法及び OLIVER法で固定し、尿素をジキサンチル尿素として組織化学的に観察して、尿素は筋肉細胞内にも存在するらしく、またアンモニアの生成量は著しいにもかかわらず比較的長い間組織に腐敗の徴候が見られないことを知つた〔科学、22, 424, (1952)〕。

水産保藏食品の研究（第1報）塩乾魚肉の保藏効果について 村 田 喜 一・大 石 圭 一

先に、村田及び大石が報告した魚肉の腐敗研究法により、塩乾魚肉の変敗を調べた。変敗は次式

$$K=\frac{S}{W-35}\times 100,$$

但しW…試料の水分量(%)， S…試料の食塩量(%)

に於て K≦50 の場合に見られる〔日水誌, 18, 541 (1953)〕。

昭和二十八年五月十五日印刷
昭和二十八年五月三十日発行

函館市港町二五三番地
北海道大学水産学部
編輯人　谷川英一

函館市恵比須町一の二
印刷所　第一印刷
電話一〇四四番、六七一四番

函館市恵比須町一の二
印刷人　板垣雄二

発行所　北海道大学水産学部

BULLETIN
OF THE
FACULTY OF FISHERIES
HOKKAIDO UNIVERSITY

Vol. 4, No. 1

CONTENTS

Studies on the Manufacture of Canned Crab.
Part I. On the Manufacture of Canned Crab from *Erimacrus isenbeckii* (*Brandt*).
Report I. The Relation between the Freshness of Raw Crab Meat Material and the Quality of the Canned Product.
I. On the Velocity of Autolytic Decomposition of Meat of *Erimacrus isenbeckii*. ..... Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Morihisa KIMURA (1)
II. Velocity of Bacterial Decomposition of the Meat of *Erimacrus isenbeckii*. ..... Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Terushige MOTOHIRO (7)
III. Discussion of Methods for Determining the Freshness of Meat of *Erimacrus isenbeckii*. ... Eiichi TANIKAWA, Minoru AKIBA and Terushige MOTOHIRO (14)
IV. Studies on the Influences of the Freshness of Raw Crab Meat and Duration of Storage after Boiling upon the Quality of Canned Crab Meat. ..... Eiichi TANIKAWA, Yasunosuke INOUE and Minoru AKIBA (22)
Behavior of Colloids in extremely diluted Solution of Polyelectrolyte as observed by the Change in Spectrum of Metachromatic Dye. ..... Kenji KATO (32)
Thermal Decomposition of Algins.
As determined by Thermo-balance Method. ..... Kenji KATO (40)
Studies on Shark Muscle.
Part 3. Putrefaction and Indol Content of Shark Meat. ..... Keiichi OHOISHI (43)
Ecological Study of the Pond Smelt, *Hypomesus olidus* (*PALLAS*).
Report 3. Uncertainty of Age Detemination by the Scale Structure on the Pond Smelt obtained from Lake Abashiri, and the reason therefor. .....Keikichi HAMADA (46)
Biochemical Studies on "Surume-Ika" (*Ommastrephes sloani pacificus*).
III. On Basic Substances in Muscle of Squid. ..... Katsuji YOSHIMURA and Takeshi SHIBATA (54)
Studies on Mechanisms of Manufacturing Algin.
Part II. On Dissolution of Free Alginic Acid. ..... Noboru SUZUKI (60)
Part III. On Dissolution of Calcium Alginate by Double Decomposition. ..... Noboru SUZUKI (65)
Part IV. On Dissolution of Calcium Alginate by Ion Exchange Reaction. ..... Noboru SUZUKI (69)
Studies on Colloidal Equilibrium in Diluted Algin Solution.
I. Viscosity Behavior of Sodium Alginate Solution. ..... Kenji KATO (76)
II. Volume Constriction of Sodium Alginate Solution. ..... Kenji KATO (82)
Chemical Studies on Marine Algae.
VII. Tyrosin and Tryptophane Content in Various Species of Marine Algae. ..... Mitsuzo TAKAGI (86)
VIII. Threonine and Serine Content in Various Species of Marine Algae. ..... Mitsuzo TAKAGI (92)
Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid."
5. On the Proteolytic Enzymes of Bacteria. (Part I)
Some Properties of the Proteolytic Enzyme of *Bacillus subtilis*
6. On the Proteolytic Enzymes of Bacteria. (Part II)
On the Activator of the Proteolytic Enzyme of *Bacillus subtilis* ..... Kiyoshi NAGAO (96)
Studies on the Bacterial Enzymes.
2. On the Catalase of *Micrococcus lysodeikticus*.(Part 1) ... Kiyoshi NAGAO(108)
Studies on the Fixed Nets in Funka Bay.
II. On the Automatic Recording Rope Tensionmeter. ..... Kiichiro KOBAYASHI and Satoshi NISHIZAWA(112)